

CAROLINE ALBERICI MARTINS

**DETECÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE FATORES RELACIONADOS À PROLIFERAÇÃO CELULAR
E AO MECANISMO DA APOPTOSE EM CISTOS RADICULARES E DENTÍGEROS**

Florianópolis

2009

CAROLINE ALBERICI MARTINS

**DETECÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE FATORES RELACIONADOS À PROLIFERAÇÃO CELULAR
E AO MECANISMO DA APOPTOSE EM CISTOS RADICULARES E DENTÍGEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração Endodontia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elena Riet Correa Rivero

Florianópolis

2009

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

M386 Martins, Caroline Alberici
 Detecção imunoistoquímica de fatores relacionados
 à proliferação celular e ao mecanismo da apoptose
 em cistos radiculares e dentígeros [dissertação] /
 Caroline Alberici Martins ; orientadora, Elena Riet
 Correa Rivero. - Florianópolis, SC, 2009.
 53 f.: il., tabs.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal
 de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde.
 Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

 Inclui bibliografia

 1. Odontologia. 2. Apoptose. 3. Imunoistoquímica.
 4. Células - Proliferação. I. Rivero, Elena Riet
 Correa. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
 Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU 616.314

Caroline Alberici Martins

**DETECÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE FATORES RELACIONADOS À PROLIFERAÇÃO
CELULAR E AO MECANISMO DA APOPTOSE EM CISTOS RADICULARES E
DENTÍGEROS**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de MESTRE EM
ODONTOLOGIA –
Área de Concentração ENDODONTIA e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

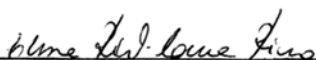
Florianópolis, 10 de julho de 2009.



Prof. Dr. Ricardo Magini

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª. Elena Riet Correa Rivero

Orientadora



Prof.ª Dr.ª. Adriana Etges

Membro



Prof. Dr. Filipe Modolo

Membro

SENHOR,

*no silêncio deste dia que amanhece, venho pedir-te a paz, a sabedoria e a força.
Quero ver hoje o mundo com os olhos cheios de amor. Ser paciente, compreensiva,
mansa e prudente, e ver além das aparências teus filhos como Tu mesmo os vê.
Guarda meu ouvido de toda calúnia, guarda minha língua de toda maldade e que
só de benção se encha meu espírito. Que todos que a mim se achegarem sintam Tua
presença. Reveste-me de Tua beleza Senhor, e que no decurso deste dia eu Te
revele a todos. Amém!*

*Aos meus pais e melhores amigos **Rainoldo e Salete**.
Por me ensinarem a viver de maneira honesta e responsável.
Por me permitirem realizar sonhos como esse.
Por acreditarem que eu seria capaz.
Por serem a razão dessa etapa vencida, e muito mais que isso...
Por serem a razão da minha vida. Amo!*

*Ao meu amado e amigo **Douglas**.
Por ter estado tão perto mesmo de tão longe.
Por nunca passar a mão em minha cabeça sob o risco de tornar-me fraca,
mas por sempre acreditar em mim e mostrar-me de alguma maneira que...
se eu quero, eu posso, eu consigo!
Te amo!*

Agradecimentos Especiais

A minha orientadora, **Elena Riet Correa Rivero**, que me guiou incansavelmente na construção desse trabalho. Obrigada por todo auxílio, toda orientação e, acima de tudo, pela imensa paciência e tranquilidade para controlar meus ímpetos e ansiedades. Mais que qualquer teoria, mais que qualquer técnica, você me presenteou com sua amizade, carinho e atenção. Obrigada por dividir comigo momentos difíceis nesse trajeto, difíceis o bastante, que me fizeram trabalhar ainda mais com sua ajuda e estímulo. **Profe** aprendi com você que podemos ser ainda mais perfeccionistas. Você é *tri legal e tudo de bom!*

Obrigada! Muito obrigada!

Aos meus professores e mestres **Wilson Tadeu Felipe e Mara Cristina Santos Felipe**, por terem tido a sabedoria de permitir que eu realizasse esse sonho no momento certo. Obrigada por todos os ensinamentos e exemplos de vida e profissionalismo. Eu tenho plena consciência que iniciei meu aprendizado com vocês.

Sempre grata!

AGRADECIMENTOS

A minha irmã **Natalia**, que me acompanhou em muitos cafés, e sempre me deixou falar e desabafar enquanto o café esfriava. Te amo e estarei por perto para festejar suas conquistas que estão chegando. Obrigada.

Aos meus amigos e amigas, e a minha família *postiça* de Florianópolis. Obrigada por cuidarem de mim, enquanto eu cuidava desse trabalho. Obrigada por tantos momentos de longas e necessárias risadas.

À Universidade Federal de Santa Catarina, mais diretamente ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, na pessoa do seu coordenador **Prof. Ricardo Magini**, por mais essa oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

Ao Laboratório de Endodontia, na pessoa do **Prof. Wilson Tadeu Felipe**, pela possibilidade da realização de experimentos, ensaios e pesquisas. Obrigada pela confiança na utilização desse espaço.

Às professoras **Ana Maria H. Alves** e **Maria Helena Pozzobon**, por serem mais que professoras. Vocês foram e são verdadeiras amigas... zelosas, carinhosas, preocupadas e sempre prontas para ajudar, não importa o momento, não importa o motivo. Não há como devolver tanta gratidão.

As minhas amigas e colegas de trabalho e estudo, **Jessie, Beatriz e Luonothar**. O apoio, a força e a ajuda de vocês não têm preço. A saudade será imensa, de cada uma, de um jeito especial, mas com toda intensidade que uma relação como a nossa pode gerar.

Aos funcionários do Laboratório de Endodontia, **Jaqueline e Sérgio**, que se tornaram pessoas indispensáveis no meu dia-a-dia. Obrigada por me “salvarem” em tantos momentos.

Ao Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitários, nas pessoas das Prof^{as}. Rozany e Daniela, por terem me recebido de maneira tão carinhosa e por fornecerem espaço, equipamentos e materiais necessários para a realização de etapas práticas do trabalho. Em especial, à **Cláudia Pinto Figueiredo**, que me ensinou e ajudou em todas as etapas teóricas e práticas de imunoistoquímica no SAP/HU, não poupando tempo e muita paciência para que eu pudesse concluir esse trabalho.

Ao professor **Sérgio Freitas**, primeiro por ter permitido que eu assistisse a suas aulas de Estatística e não suficientemente, por ter me ensinado os testes estatísticos com humildade e bondade incríveis.

Aos colegas e professores, **Cleonice e Eduardo**, por sempre me incentivarem e por terem se tornado exemplos de perseverança. Parabéns pelas conquistas e obrigada pelo apoio.

Ao professor **Cleo Nunes de Souza**, por estar sempre perto para ajudar, aconselhar e conversar durante todos esses anos de UFSC. Muito obrigada querido professor e amigo.

A querida **Mabel Cordeiro**, por estar sempre disposta a ajudar, com um sorriso sereno e tão necessário. Você é muito especial!

A **TODOS** os amigos que conquistei durante esse período e que de alguma maneira contribuíram para a realização desse sonho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRs - Cistos radiculares

CDs - Cistos dentígeros

% - por cento

pH - potencial hidrogênico

ATPS – “3-aminopropyltriethoxysilene”

mM - milimolar

M - molar

µm - micrometro

PBS - tampão fosfato salina

°C - graus centígrados

TNF - fator de necrose tumoral

TNFR1 - receptor 1 do fator de necrose tumoral

HE - hematoxilina e eosina

LSAB - estreptavidina-biotina-peroxidase

DAB - diaminobenzidina

Caspase-3 – “CysteinyI aspartic acid-protease-3”

Ki-67 - proteína não-histona de proliferação celular

Bcl-2 – “B-cell lymphoma protein 2”

Na⁺ - íon sódio

K⁺ - íon potássio

Cl⁻ - íon cloro

Ca²⁺ - íon cálcio

Mg²⁺ - íon magnésio

DNA - ácido desoxirribonucléico

Fas – “Fatty acid syntethase”

Bax – “Bcl-2 associated X protein”

Apaf – “Apoptotic protease activating factor”

SMAC/DIABLO – “Second mithochondrial activator of caspases/ direct IAP binding protein with low PI”

Omi/HTRA-2 – “High-temperature requirement”

Bcl-XL – “Bcl-2 related protein, long isoform”

Bak – “Bcl-2 antagonist killer 1”

Bcl-XS – “Bcl-2 related protein, short isoform”

Bad – “Bcl-2 antagonist of cell death”

Bik – “Bcl-2 interacting killer”

Bim – “Bcl-2 interacting protein BIM”

ATP - Adenosina trifosfato

TIFF – “Tagged Image File Format”

GIF – “Graphics Interchange Format”

JPEG – “Joint Picture Expert Group”

BMP - bitmat ou mapeamento de bits

DICOM – “Digital Imaging and Communications in Medicine”

FITS – “Flexible Image Transport System”

t - teste estatístico *t* de Student

P - valor de significância

χ^2 - teste estatístico Qui-quadrado

MARTINS, C. A. **Detecção imunoistoquímica de fatores relacionados à proliferação celular e ao mecanismo da apoptose em cistos radiculares e dentígeros**. 2009. 53f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Esse estudo propôs investigar os aspectos relacionados à proliferação celular e ao mecanismo da apoptose no epitélio de revestimento de cistos radiculares (CRs) e dentígeros (CDs). Seções seriadas de 17 cistos radiculares e nove cistos dentígeros foram preparadas para detecção imunoistoquímica, pelo método estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB), dos antígenos Caspase-3 (pró-apoptótico), Bcl-2 (anti-apoptótico) e do marcador de proliferação celular Ki-67. A análise e quantificação das reações foram obtidas com auxílio do programa NIH ImageJ. O marcador Caspase-3 foi detectado principalmente nas camadas suprabasal e superficial de CRs e CDs, enquanto a expressão de Ki-67 foi predominante na camada basal dessas lesões. Ambos marcadores tiveram expressão mais significativa em epitélios hiperplásicos, relacionados a um intenso infiltrado inflamatório na cápsula conjuntiva. A expressão de Bcl-2 foi observada exclusivamente na camada basal do epitélio, com diminuição em áreas associadas a infiltrado inflamatório na cápsula. Nos CDs a expressão de Bcl-2 foi significativamente maior quando comparada aos CRs. Esses resultados sugerem que a atividade proliferativa dos cistos é balanceada pela apoptose, agindo como um mecanismo regulador na manutenção da espessura do revestimento epitelial. Demonstrou-se, ainda, que o processo inflamatório inibe a expressão de Bcl-2, sendo esse resultado mais evidente em CRs. Os cistos dentígero e radicular apresentam mecanismos distintos de formação, mas possuem comportamento biológico semelhante do revestimento epitelial diante da presença de intenso infiltrado inflamatório na cápsula de tecido conjuntivo fibroso.

Palavras-chave: apoptose, imunoistoquímica, cisto radicular, cisto dentígero, proliferação celular.

MARTINS, C. A. **Immunohistochemical detection of related factors to cellular proliferation and apoptosis mechanism in radicular and dentigerous cysts**. 2009. 53f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

This study proposed to investigate the aspects related to cell proliferation and the mechanism of apoptosis in epithelial linings of radicular cysts (RCs) and dentigerous cysts (DCs). Serial sections of 17 RCs and nine DCs were prepared for immunohistochemical detection, by the method streptavidin-biotin-peroxidase (LSAB), of antigens Caspase-3 (pro-apoptotic), Bcl-2 (anti-apoptotic) and of the cell proliferation marker Ki-67. The analysis and quantification of the reactions were obtained using the program NIH ImageJ. The marker Caspase-3 was detected mainly in the suprabasal and superficial layers of RCs and DCs, while the expression of Ki-67 was predominantly in the basal layer of these lesions. Both markers had higher expression in hyperplasic epithelium, related to an intense inflammatory infiltrate in conjunctive capsule. The expression of Bcl-2 was observed exclusively in the basal layer of the epithelium, with a reduction in areas associated with inflammatory infiltration in the capsule. The expression of Bcl-2 in DCs was significantly higher when compared to the RCs. These results suggest that the proliferative activity of the cysts is balanced by apoptosis, acting as a regulatory mechanism in maintaining the thickness of the lining epithelium. It was shown also that the inflammatory process inhibits the expression of Bcl-2, this result was more evident in RCs. The dentigerous and radicular cysts have different mechanisms of formation, but have similar biological behavior of the epithelial lining facing the presence of intense inflammatory infiltrate in the capsule of fibrous connective tissue.

Keywords: apoptosis, immunohistochemistry, radicular cyst, dentigerous cyst, cellular proliferation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL

| | |
|---|----|
| 1.1 CISTOS ODONTOGÊNICOS..... | 14 |
| 1.2 APOPTOSE..... | 16 |
| 1.3 MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR..... | 18 |
| 1.4 IMAGEJ..... | 19 |
| 1.5 OBJETIVOS..... | 21 |

2 ARTIGO

22

| | |
|------------------------------|----|
| 2.1 RESUMO..... | 23 |
| 2.2 INTRODUÇÃO..... | 24 |
| 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 26 |
| 2.4 RESULTADOS..... | 29 |
| 2.5 DISCUSSÃO..... | 31 |
| 2.6 REFERÊNCIAS..... | 34 |
| 2.7 FIGURAS..... | 37 |
| 2.8 TABELAS..... | 38 |

3 ARTIGO EM INGLÊS

39

| | |
|----------------------------|----|
| REFERÊNCIA CONSULTADA..... | 55 |
|----------------------------|----|

APÊNDICES

| | |
|--------------------------------|----|
| A – METODOLOGIA EXPANDIDA..... | 59 |
| B – FOTOMICROGRAFIAS..... | 61 |
| C – FIGURAS..... | 65 |

ANEXOS

| | |
|---|----|
| A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..... | 66 |
| B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA - CEP/UFSC..... | 67 |

INTRODUÇÃO GERAL

1 Considerações gerais sobre os cistos odontogênicos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as inflamações periapicais são classificadas em cinco categorias: periodontite apical aguda, periodontite apical crônica ou granuloma apical, abscesso periapical sem fístula, abscesso periapical com fístula e cisto radicular (1). A patogênese das periodontites apicais está geralmente relacionada à necrose pulpar e disseminação dos microorganismos e seus produtos para os tecidos periapicais (2), sendo que os cistos radiculares podem representar de 6% a 55% dessas lesões (3, 4). Estudos recentes, baseados em critérios histopatológicos rigorosos e secções teciduais seriadas meticulosas, têm mostrado que essa taxa pode ser inferior a 20% (5).

A grande maioria dos cistos maxilares se origina a partir do epitélio odontogênico, sendo então denominados de cistos odontogênicos. Os cistos são caracterizados por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, revestida por epitélio, delimitando uma cavidade central (Apêndice C1). Essas lesões são frequentemente encontradas na clínica odontológica e de acordo com a etiologia são classificadas em cistos de desenvolvimento e inflamatórios (6, 7). O cisto dentígero é um exemplo de cisto de desenvolvimento, pois sua patogênese está relacionada ao acúmulo de fluido entre a coroa dental e o epitélio reduzido do órgão do esmalte, e secundariamente à proliferação epitelial estimulada por um processo inflamatório (8, 9). Histologicamente, os cistos dentígeros são caracterizados por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, frouxamente organizado, revestida por um epitélio com poucas camadas, normalmente uma a três, que por vezes lembra o epitélio reduzido do órgão do esmalte. Quando associado à inflamação na cápsula, o epitélio se apresenta hiperplásico e geralmente pavimentoso (10). Por outro lado, os cistos radiculares são lesões de origem inflamatória, desenvolvidas a partir da necrose pulpar. Histologicamente são formados por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso denso, revestida por epitélio pavimentoso estratificado, o qual se apresenta hiperplasiado por acantose, especialmente em áreas relacionadas à maior infiltrado inflamatório na cápsula de tecido conjuntivo (10, 11).

Há duas classes distintas de cistos radiculares, o cisto verdadeiro que possui uma cavidade completamente fechada e circundada por epitélio, e o cisto *pocket*, descrito originalmente como cisto baía, no qual o epitélio reveste uma cavidade com comunicação direta com o canal radicular (6, 7, 12). Até pouco tempo, o relato da incidência dos cistos verdadeiros entre as lesões císticas era inferior a 10% (9), no entanto, recentemente tem sido demonstrado que mais da metade das lesões císticas são cistos apicais verdadeiros (5).

Muitos estudos propõem teorias para a formação dessas lesões. Aproximadamente de 30% a 52% das periodontites apicais contêm proliferação epitelial (6). Durante a inflamação periapical, os restos epiteliais de Malassez são estimulados a proliferar por mediadores inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento, servindo como fonte epitelial para o desenvolvimento dos cistos radiculares (5, 11). Acredita-se, em parte, que os restos celulares epiteliais de Malassez sejam consequência da apoptose incompleta da bainha epitelial de Hertwig durante a rizogênese, permanecendo quiescentes no ligamento periodontal até o recebimento de um estímulo proliferativo (13).

A gênese do cisto verdadeiro ocorre em três estágios. Na primeira fase, os restos epiteliais de Malassez proliferam pela influência de fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias residentes na lesão crônica. Na segunda fase há a formação de uma cavidade revestida por epitélio, que contempla duas teorias amplamente discutidas. A teoria da *deficiência nutricional* demonstra que as células epiteliais centrais sofrem necrose e degeneração por se encontrarem distantes da fonte nutricional, atraindo neutrófilos para dentro da área necrótica. Assim, microcavidades coalescem para formar uma cavidade cística revestida por epitélio pavimentoso estratificado, contendo restos celulares, infiltrado de leucócitos e exsudato tecidual no seu interior (4, 6, 14, 15). Já a teoria do *abscesso* postula que o epitélio em proliferação circunda um abscesso formado por necrose e lise tecidual, devido a natureza inata do epitélio de recobrir superfícies de tecido conjuntivo exposto (16). Na última fase ocorre o crescimento do cisto, cujo mecanismo ainda não está completamente esclarecido.

A presença de neutrófilos no lúmen do cisto atrai mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas (PG), enquanto linfócitos-T localizados na cápsula produzem citocinas pró-inflamatórias. As prostaglandinas e as citocinas pró-inflamatórias ativam osteoclastos, resultando na reabsorção da matriz óssea (5). A presença de moléculas efetoras como metaloproteinases (MMPs 1, 2 e 9) promove o estímulo para a reabsorção óssea e conseqüentemente a manutenção do crescimento da lesão (17).

O cisto *pocket* provavelmente se forma pelo acúmulo de neutrófilos ao redor do forame apical em resposta à presença bacteriana no terço apical do canal radicular. Os micro-abscessos formados são então revestidos pelo epitélio proliferado, formando um cordão epitelial em contato com o ápice radicular. A presença de microorganismos e seus produtos no canal radicular atraem mais leucócitos polimorfonucleares por quimiotaxia para dentro da cavidade cística, que se expande em associação à reabsorção óssea periférica (5, 6, 16).

A presença de uma lesão cística periapical, acúmulo de cristais de colesterol e microorganismos são citados como fatores que comprometem o resultado do tratamento endodôntico (18). Lesões periapicais extensas podem não reparar, e a cirurgia periapical ou até mesmo a extração do dente envolvido podem ser necessárias para permitir o reparo da lesão. A intervenção cirúrgica é recomendada apenas se, ao final de um tempo de dois anos de controle clínico-radiográfico, os resultados demonstrarem insucesso do tratamento conservador, seja pela presença de sinais radiográficos como aumento da lesão, ou ainda pela presença de sintomatologia e sinais clínicos (18). Dentre as terapias cirúrgicas para tratamento de lesões císticas extensas, a marsupialização é a menos invasiva, apesar de apresentar algumas desvantagens como o uso de drenos por longo período de tempo e a dificuldade de higiene da cavidade cirúrgica (19).

Mesmo diante da insistência de muitos profissionais pela escolha da terapia cirúrgica, muitos estudos têm relatado taxas significativas de reparo de lesões compatíveis radiograficamente com cistos radiculares após o tratamento endodôntico, com índices de cura que variam de 80% a 95% (3, 11, 12, 19 - 21).

2 Considerações sobre apoptose

O termo apoptose foi utilizado primeiramente por Kerr, Wyllie e Currie em 1972, para descrever um mecanismo morfológicamente distinto de morte celular, ativado normalmente durante o desenvolvimento dos tecidos e na regulação da homeostasia para manter populações celulares (22). Esse processo de morte celular programada é fundamental durante o desenvolvimento oral, na progressão de doenças orais, no desenvolvimento de lesões perirradiculares, nas reabsorções fisiológica e patológica, na resposta inflamatória, em certos efeitos farmacológicos e no processo de reparo (13, 23, 24). Estudos têm demonstrado que esse mecanismo também é responsável pela regressão da bainha epitelial de Hertwig, caracterizada pela fusão do epitélio interno e externo do órgão do esmalte e responsável pelo estímulo aos odontoblastos durante a rizogênese. No entanto, devido alguma sinalização molecular ainda não esclarecida, a morte celular dessas células é incompleta, resultando nos restos celulares epiteliais de Malassez, que se comportam como células indiferenciadas e permanecem quiescentes no espaço do ligamento periodontal (4, 11).

A apoptose pode ser induzida por processos fisiológicos (desenvolvimento normal de tecidos e órgãos) e patológicos (destruição de linfócitos T, radiação, presença de toxinas, resposta imune de células mediadoras, reparo cicatricial). Esse tipo de morte celular é desencadeado quando a célula não recebe fatores de sobrevivência (como fatores tróficos) ou quando recebe sinais de morte, como TNF (fator de necrose tumoral) ou Fas (sintetase de ácido graxo) (9, 22, 25).

O processo de apoptose envolve várias alterações morfológicas: o tamanho da célula diminui, as organelas ficam mais agrupadas e o citoplasma mais denso; a cromatina se condensa na periferia da membrana nuclear, e o núcleo pode se romper em dois ou mais fragmentos; há formação de bolhas citoplasmáticas que se fragmentam originando os corpos apoptóticos ligados à membrana. Os corpos apoptóticos consistem em compostos de citoplasma e organelas bem compactados, com ou sem a presença de fragmentos nucleares e envolvidos por uma membrana celular intacta, e por essa razão são rapidamente degradados pelos lisossomos e fagocitados geralmente por macrófagos (22 - 24). Através da microscopia óptica é possível detectar a condensação nuclear e os corpos apoptóticos em células coradas com cromógenos como hematoxilina e eosina (HE) ou azul de metil e eosina (23, 26).

A diminuição do tamanho da célula é uma das características mais relevantes das alterações morfológicas. A água é o responsável primário pelo volume celular, que é controlado por alterações em partículas osmoticamente ativas, como os íons sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloro (Cl^-). A deficiência do funcionamento da bomba de sódio e potássio através de eventos moleculares ainda não bem esclarecidos, resulta na retração celular e participa do controle dos eventos de sinalização do início da apoptose (23, 24).

O DNA nas células apoptóticas apresenta uma decomposição característica de 50 a 300 quilobases. Posteriormente, endonucleases dependentes de cálcio (Ca^{2+}) e (Mg^{2+}) promovem a clivagem internucleossomal do DNA em oligonucleossomos, em múltiplos de 180 a 200 pares de bases. Porém, a degradação do DNA também é indicativa de necrose. O que difere esses dois mecanismos de morte celular é a expressão de fosfatidilserina nas camadas mais externas da

membrana plasmática de células apoptóticas, devido a alteração da posição dos fosfolipídios da membrana interna para externa. Tais alterações permitem o reconhecimento precoce das células apoptóticas pelos macrófagos, resultando na fagocitose sem haver a liberação de componentes celulares que induzem a inflamação (25).

As células apoptóticas apresentam muitas modificações bioquímicas, como por exemplo, a hidrólise de proteínas relacionadas à ativação de vários membros de uma família de citoproteases denominadas de caspases (protease ácido aspártico cisteinil) (22).

As caspases estão presentes nas células normais como pré-enzimas inativas e são proteoliticamente processadas através da clivagem do ácido aspártico, seja por outras proteases ou ainda por um processo autônomo (27). Essas caspases quando ativas clivam muitas proteínas celulares vitais, tais como as lamininas, destruindo a estrutura nuclear e o citoesqueleto; além de ativar as DNases responsáveis pela degradação do DNA nuclear (23, 26 - 29). A apoptose é induzida por uma cascata de eventos moleculares que podem ser iniciados por estímulos externos ou internos, convergindo na ativação das caspases (22, 25, 30).

A via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de morte da superfície celular que transmitem sinais apoptóticos para o interior da célula após sua conexão com ligantes extracelulares específicos. Os receptores de morte mais conhecidos são os receptores TNFR1 e uma proteína denominada Fas (CD95), membros da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF). Esses receptores são essenciais para a ativação das caspases iniciadoras 8 e 10, que por sua vez ativam as caspases efetoras 3, 6 e 7, resultando na apoptose (26, 30, 31).

Já a via intrínseca resulta do aumento da permeabilidade mitocondrial e da liberação de moléculas pró-apoptóticas no citoplasma através de sinais positivos e negativos. Sinais negativos envolvem a ausência de certos fatores de crescimento, hormônios e citocinas, enquanto sinais positivos incluem radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecção viral e radicais livres. Todos esses fatores causam mudanças no interior da membrana mitocondrial resultando no aumento de sua permeabilidade e a liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo c. Essa proteína se liga ao fator de ativação 1 da apoptose (Apaf-1) e à prócaspase-9, formando o “apoptossomo” responsável pela ativação da caspase-9, que por sua vez ativa as prócaspases efetoras resultando na execução da morte celular (23, 30).

A permeabilidade da membrana mitocondrial para o citocromo c é determinada pela proporção relativa de mediadores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Uma das principais proteínas anti-apoptóticas é a Bcl-2, que normalmente reside na membrana mitocondrial e no citoplasma, agindo como um supressor da morte sem conferir vantagens proliferativas (29, 32). Essa proteína impede a liberação do citocromo c, possivelmente pela formação de heterodímeros com moléculas pró-apoptóticas (22). Quando as células são privadas de sinais de sobrevivência ou expostas ao estresse, elas perdem Bcl-2 da membrana mitocondrial, sendo substituída por membros pró-apoptóticos da família, como BAX (proteína X associada à Bcl-2) (25, 29). Quando proteínas como BAX são translocadas da intermembrana mitocondrial, há um aumento na viabilidade do citocromo c para formar o apoptossomo (26). A via intrínseca também resulta na estimulação da morte celular pela liberação de SMAC/DIABLO (ativador da caspase pela via mitocondrial/ ligação direta do fator de

inibição da apoptose com a proteína com baixo fator de inibição) e Omi/HTRA-2 (requisito de alta temperatura), apoptógenos que neutralizam a ação de fatores de inibição da apoptose (IAPs) (22, 26, 30).

As proteínas BAX e Bcl-2 são membros da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*), identificada como um oncogênico em linfomas de células B e que possui aproximadamente 30 proteínas conhecidas envolvidas na ativação ou inibição da apoptose. As proteínas anti-apoptóticas consistem em Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-M, Bfl-1, Brsag-1, Mcl-1, A1, E1b19k, Lmw5-HI e Bhrl-1, enquanto que as pró-apoptóticas são Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bik, Hrk, Bim e Bok (25, 30, 33).

A duração de todo ciclo apoptótico ocorre rapidamente, em questão de duas a três horas. Através da histologia convencional nem sempre é fácil distinguir a apoptose da necrose, além disso, elas podem ocorrer simultaneamente dependendo de fatores como intensidade e duração dos estímulos, a extensão da queda de energia (ATP) e a viabilidade das caspases (22). Por esse motivo, o método imunoistoquímico vem sendo amplamente utilizado com o objetivo de melhor caracterizar as células apoptóticas pela detecção de proteínas específicas dessa via de morte celular (34).

A apoptose tem sido considerada um processo irreversível, com a ativação das caspases resultando na morte celular e a condensação genética sinalizando a remoção da célula morta pelos macrófagos. Entretanto, autores têm mostrado que a célula pode sobreviver diante de sinais apoptóticos fracos, ou ainda por uma mutação genética após a compactação celular aumentando a frequência da sobrevivência dessa célula. Entretanto, essa mutação também pode permitir a sobrevivência e diferenciação de algumas células que, por outro lado, seriam destinadas a morrer via apoptose (22).

A ativação das caspases representa o papel central dos fatores bioquímicos e morfológicos para desencadear a apoptose. Os mecanismos moleculares de ativação e ação dessas proteínas não estão completamente desvendados, mantendo a necessidade da continuidade das pesquisas. Essa via de morte celular programada é um componente fisiológico e patológico, portanto, quanto maior o seu esclarecimento, mais seguras e precisas serão as estratégias e intervenções terapêuticas.

O processo inflamatório em cistos odontogênicos está diretamente relacionado à ativação da apoptose. A presença da inflamação atrai para a área agredida, além de células inflamatórias como neutrófilos e leucócitos, mediadores inflamatórios como prostaglandinas (PG) e interleucinas (IL-6) que estimulam a proliferação celular epitelial, e citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF). Essa proliferação celular por sua vez estimula a apoptose, que ocorre na tentativa de controlar a população celular em proliferação. (4, 31). Sabe-se que a apoptose participa não só da renovação celular do revestimento epitelial de cistos odontogênicos inflamatórios auxiliando na manutenção dessas lesões, mas também do processo de reparo após a remoção dos fatores patógenos (22, 25).

3 Considerações sobre proliferação celular

O tamanho e a atividade funcional dos tecidos ou órgãos dependem do balanço entre a proliferação e morte celular (35). O ciclo celular é dividido tradicionalmente em interfase e mitose. A

interfase é um período de intensa atividade relacionada com a proliferação celular e divide-se em G_1 , S, G_2 e G_0 . O início do ciclo celular corresponde à fase G_1 , caracterizada por um aumento da síntese protéica e do tamanho celular, seguida da fase S, correspondente à síntese e duplicação do conteúdo de DNA. A fase G_2 fornece um intervalo de segurança, de maneira que a célula possa assegurar uma completa replicação do DNA, antes de iniciar a mitose, enquanto G_0 representa um estágio fisiológico no qual a célula pode retornar ao ciclo proliferativo, continuar viva sem divisão ou morrer por apoptose (36, 37).

A contagem de figuras mitóticas é o método mais tradicional para a obtenção do índice de proliferação celular, o principal problema desse método é a dificuldade de reconhecimento das figuras mitóticas com a conseqüente baixa reprodutibilidade entre diferentes observadores (37). Outro método muito utilizado para detectar e quantificar células em proliferação é o uso de marcadores imunoistoquímicos, como o antígeno Ki-67.

O antígeno ki-67 é uma proteína não-histona com peso molecular por volta de 345 a 395 kDa, codificado por um único gene no cromossomo 10, fazendo parte da matriz nuclear durante a interfase e ligando-se aos cromossomos durante a mitose (36 - 38). Histonas são proteínas citoplasmáticas de vida curta que são superreguladas apenas durante a fase S do ciclo celular. Já Ki-67 é produzido no núcleo das células durante as fases G_1 , S, G_2 e M do ciclo celular, sendo ausente na fase de descanso G_0 . Por esta razão, esse antígeno é considerado um dos marcadores mais confiáveis de proliferação celular (39). Sua expressão aumenta com a progressão do ciclo celular e alcança altos níveis durante as fases G_2 e M (36, 40).

4 Considerações sobre métodos de quantificação da técnica imunoistoquímica e o programa NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland, EUA)

O aumento da utilização da imunoistoquímica (IHC) em pesquisas clínicas e de base permitiu o desenvolvimento de técnicas para aquisição de informações quantitativas dos níveis imunoistoquímicos. O cromógeno diaminobenzidina (DAB), seguido da contracoloração por hematoxilina, é usado frequentemente para detecção das reações positivas, fornecendo uma coloração castanha em um fundo tecidual azul. Visualmente, um observador pode diferenciar entre duas cores quando a coloração da marcação é forte. Entretanto, baixos níveis da coloração do anticorpo podem dificultar a separação das áreas de fundo (34). Essa dificuldade permite variações nos resultados dos padrões de imunocoloração obtidos pelo método manual. Métodos de análise de imagens que reduzem a dependência do observador podem diminuir o tempo de análise e as variações dos resultados.

Desenvolvido por Wayne Rasband do setor de serviços de pesquisas do Instituto Nacional de Saúde, Bethesda (Maryland, EUA), o software NIH ImageJ pode exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens em diversos formatos, incluindo TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM e FITS (41, 42).

Esse programa vem sendo amplamente utilizado em análise de imagens para quantificar as reações imunoistoquímicas. A técnica é baseada na conversão das imagens em um formato que

permite a separação máxima dos pixels da coloração por DAB do fundo tecidual, permitindo a quantificação dos parâmetros positivos através, por exemplo, da porcentagem de células coradas, intensidade e densidade óptica integrada, além da contagem simples das reações positivas (34).

Métodos automatizados são sensíveis às técnicas de laboratório, requerendo a padronização rigorosa dos protocolos técnicos, desde a fixação do material, diluições dos reagentes, tempo de coloração etc., até a seleção de imagens de controle apropriada e determinação crítica dos parâmetros que definem a positividade das reações (34, 43).

Antes de utilizar o programa é necessário o pré-tratamento das imagens através da determinação do melhor contraste que facilite a detecção das marcações positivas e a criação de um Macro. O Macro é o esquema padrão determinado pelo operador para definir as marcações positivas que o programa deverá reconhecer em cada imagem analisada. A partir de uma imagem controle (caso controle positivo) cria-se uma limiarização (*thresholding*), uma seleção de forma e intensidade das marcações que devem ser reconhecidas como positivas e que é salva em formato de texto denominado Macro (42, 43).

A utilização de protocolos técnicos standardizados para análise de imagens, como o software ImageJ, garante a reprodutibilidade das condições de medida e certifica o que está sendo realizado. Deve-se levar em consideração que as medições obtidas pelo método de contagem manual são muito suscetíveis a erros e à falta de precisão, pois se baseiam em critérios subjetivos para as interpretações (43).

5 Objetivos

Objetivo Geral

Contribuir para a caracterização de aspectos da proliferação celular e do mecanismo da apoptose no epitélio de revestimento de cistos radiculares e dentígeros.

Objetivos Específicos

Calcular a frequência da expressão das proteínas Bcl-2, caspase-3 e Ki-67 nos cistos radiculares e dentígeros;

Analisar o local da expressão das proteínas Bcl-2, caspase-3 e Ki-67 nas diferentes camadas epiteliais: basal, suprabasal e superficial nos cistos radiculares e dentígeros;

Avaliar a associação da expressão das proteínas Bcl-2, caspase-3 e ki-67 nos epitélios atróficos e hiperplásicos;

Estudar as diferenças encontradas nas expressões das proteínas Bcl-2, caspase-3 e Ki-67 nos cistos radiculares e dentígeros;

Correlacionar os achados desse estudo com os já existentes na literatura.

ARTIGO

Deteção imunoistoquímica de fatores relacionados à proliferação celular e ao mecanismo da apoptose em cistos radiculares e dentígeros.

Caroline Alberici Martins

Estudante de Mestrado em Odontologia, área de concentração Endodontia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Elena Riet Correa Rivero*

Doutora em Patologia; Professora Adjunto II do Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

***Autor correspondente**

Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade - Florianópolis
CEP: 88.040-370 – SC – Brasil
Fone: +55 48 37215068
e-mail: riet@ccs.ufsc.br

RESUMO

Esse estudo propôs investigar aspectos relacionados à proliferação e morte celular no epitélio de cistos radiculares (CRs) e dentígeros (CDs). Secções seriadas de 17 CRs e nove CDs foram preparadas para detecção imunoistoquímica, pelo método estreptavidina-biotina-peroxidase, dos antígenos Caspase-3, Bcl-2 e do marcador de proliferação celular Ki-67. A Caspase-3 foi detectada principalmente nas camadas suprabasal e superficial do epitélio de CRs e CDs, enquanto que Ki-67 foi detectado predominantemente na camada basal. Ambos marcadores tiveram expressão significativa em epitélios hiperplásicos, relacionados à intensa inflamação na cápsula. A imunopositividade para Bcl-2 foi exclusiva à camada basal e foi significativamente maior em epitélio atrófico de CDs quando comparada aos CRs. Esses resultados sugerem que a proliferação epitelial é balanceada pela apoptose, e que a presença da inflamação inibe a expressão de Bcl-2. Os cistos dentígero e radicular apresentam mecanismos distintos de formação, mas possuem comportamento biológico semelhante diante da presença de intenso infiltrado inflamatório.

Palavras-chave: apoptose, cisto dentígero, cisto radicular, imunoistoquímica, proliferação celular.

INTRODUÇÃO

As periodontites apicais se originam pela colonização progressiva de microorganismos e seus produtos nos tecidos periapicais, provenientes da infecção e necrose pulpar em decorrência da cárie dentária (1, 2). Os cistos radiculares são os mais comuns dos cistos maxilares e representam de 6% a 55% das periodontites apicais (3). A sua formação é associada à ativação e proliferação dos restos epiteliais de Malassez por estímulos inflamatórios (2, 4). Outro cisto muito frequente é o cisto dentígero, formado pelo acúmulo de fluido entre a coroa de um dente incluído e o epitélio reduzido do órgão do esmalte (5, 6). Uma vez formados, os cistos podem crescer por diferentes mecanismos, incluindo acúmulo de fluido e proliferação epitelial regulada por mecanismos moleculares (1).

Muitos profissionais optam pela remoção cirúrgica de lesões radiográficas compatíveis com cistos radiculares (7). Contudo, estudos têm apresentado índices de sucesso entre 85%-95% de lesões radiograficamente compatíveis com cistos radiculares que repararam após o tratamento endodôntico do dente envolvido (1, 8, 9). Biologicamente há muitas hipóteses para explicar os mecanismos de reparo após a terapia endodôntica. As células epiteliais do revestimento dos cistos podem parar de proliferar, devido a redução de mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e citocinas inflamatórias (10). Além disso, a ausência de fatores de crescimento e/ou a presença de sinais de morte induzem a apoptose, que participa do controle da sobrevivência celular. A falta de fatores ambientais favoráveis no tecido, e a presença da apoptose inviabilizam a proliferação celular, e consequentemente o crescimento da lesão (11, 12).

A apoptose é um programa intracelular altamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e proteínas responsáveis pela arquitetura celular. Nesse processo, a membrana celular permanece intacta e os corpos apoptóticos, contendo organelas densas e compactadas, com ou sem a presença de material genético, são rapidamente removidos por macrófagos ou por fagócitos não-profissionais. Dessa maneira, a apoptose difere da necrose, sendo descrita como um processo de limpeza por prevenir a liberação do conteúdo celular tóxico que desencadearia o processo inflamatório (13 - 16). As células apoptóticas apresentam muitas modificações bioquímicas, que são as bases das alterações estruturais. Um aspecto característico é a hidrólise de proteínas envolvidas na ativação de membros de uma família de citoproteases, denominadas de caspases (14, 17, 18). As caspases se dividem funcionalmente em caspases iniciadoras e efetoras, classificadas de acordo com a ordem de ativação dessas enzimas durante a apoptose. A caspase-3 é exemplo das efetoras e sua expressão é considerada essencial para a ativação do processo (17 - 19).

O início da apoptose ocorre principalmente através de duas vias, a extrínseca ou via de receptor de morte e a intrínseca ou mitocondrial, que convergem para ativar as caspases (18, 20). A via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de morte celular como TNFR1 e a proteína Fas, membros da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (13, 21). Já a via intrínseca é resultado do aumento da permeabilidade mitocondrial e da liberação de moléculas pró-apoptóticas no citoplasma, como o citocromo c. Fatores de crescimento e outros sinais de sobrevivência estimulam a

produção de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*). Essa família é constituída por um grupo de mais de 20 proteínas, cuja função é regular a apoptose (19, 21). A Bcl-2 é uma das principais proteínas antiapoptóticas, normalmente localizada na membrana mitocondrial e no citoplasma favorecendo a sobrevivência celular (16). Quando ativada impede a liberação do citocromo c prolongando a sobrevivência celular sem conferir vantagens proliferativas (14, 22).

Na literatura indexada não há conhecimento de estudos comparando os mecanismos biológicos da formação, crescimento e regressão dos cistos radiculares e cistos dentígeros, nos quais a proliferação celular e a apoptose estão diretamente envolvidas. Os trabalhos existentes afirmam que a apoptose participa do controle da população das células epiteliais, mas tem sido pouco estudada a relação desse mecanismo com as distintas camadas celulares do epitélio de revestimento dos cistos e o estado funcional dos mesmos. Além disso, os relatos de altos índices de reparo de lesões compatíveis com cistos radiculares através da terapia endodôntica abordam as características clínico-radiográficas, mas sem considerar os aspectos biológicos que são ainda mais complexos e relevantes.

O objetivo desse estudo foi contribuir para a caracterização de fatores relacionados à proliferação e morte celular no epitélio de revestimento de cistos radiculares e dentígeros em distintos estados funcionais, por meio da detecção imunoistoquímica das proteínas relacionadas à apoptose, Bcl-2 e caspase-3, e do marcador de proliferação celular Ki-67.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 Seleção dos casos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFSC, sob protocolo 017/09 FR 241392.

Foram pré-selecionados 20 casos de cistos radiculares e 20 de cistos dentígeros provenientes dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), referentes aos exames histopatológicos rotineiros realizados entre o período de 2006-2009, em pacientes com idade mínima de 18 anos. Todos os casos já haviam sido fixados em formol e incluídos em parafina, e apresentavam no mínimo uma secção montada em lâmina histológica corada em hematoxilina e eosina (HE). Após serem informados sobre a pesquisa os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Como critérios de inclusão consideraram-se, além da assinatura do termo de consentimento pelo paciente, o bom estado de conservação dos blocos e a presença de epitélio de revestimento na análise microscópica das lâminas coradas em HE (aumento de 10X), em pelo menos 3/4 da lesão. Ao final, obteve-se uma amostra de 17 cistos radiculares e nove cistos dentígeros.

2 Reação imunoistoquímica

Para todos os anticorpos utilizados nesse estudo, os espécimes foram submetidos à técnica imunoistoquímica pelo método enzimático estreptavidina-biotina (LSAB). Os procedimentos técnicos foram realizados no Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitário (HU) da UFSC, seguindo o protocolo padronizado pelo mesmo.

Cortes teciduais seriados de 3µm de espessura, montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona, foram desparafinizados em xilol e hidratados com passagens sucessivas em soluções decrescentes de etanol.

Previamente à incubação com os soros primários, as lâminas foram incubadas em solução de peróxido de hidrogênio a 3,0% por 20 minutos para bloqueio da atividade endógena da peroxidase. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em solução tampão citrato 0,01M em pH 6,0 (MERK, São Paulo/SP, Brasil) por 45 minutos em banho-maria à temperatura de 95-98°C com o objetivo de reativar os sítios antigênicos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram imersas em solução salina tampão fosfato (PBS) 10mM, pH 7,2-7,4 (SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA).

Foram utilizados anticorpos de rato anti-humano para detecção dos antígenos Bcl-2, Ki-67 e caspase-3 (Tabela 1), utilizando-se um corte tecidual para cada reação. A incubação primária foi obtida adicionando a solução de anticorpos, diluída segundo as orientações do fabricante, sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida entre 2-8°C por 12 horas. Após esse período foi realizada dupla lavagem dos cortes em tampão PBS por 5 minutos cada, à temperatura

ambiente, seguida da incubação com anticorpo secundário anti-IgG biotilado conjugado com um polímero de peroxidase (EN VISION PLUS, Dako Cytomation, Dinamarca) pronto para uso, durante uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Passado o período de incubação, as amostras foram lavadas por duas vezes em PBS por 5 minutos cada à temperatura ambiente.

Para detecção da reação imunoistoquímica, as amostras foram cobertas por 3-5 minutos com solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzindina (DAB) previamente diluída em tampão imidazol pH 7,2 e peróxido de hidrogênio a 0,3% (Dako, Glostrup, Dinamarca). A contracoloração foi obtida pela imersão das lâminas em hematoxilina de Harris.

Por fim, foram realizados os processos de desidratação em etanol, diafanização em xilol e montagem definitiva com ENTELLAN® (MERCK, Darmstadt, Germany). O controle negativo para cada caso foi obtido pela abolição do anticorpo primário nas reações e para controle positivo foi utilizado um caso de linfonodo. O resultado positivo foi observado pela presença de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos.

3 Análise imunoistoquímica

As lâminas foram examinadas em microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) com câmera digital (Cannon A620) acoplada, em uma magnitude final de 400X. A imunopositividade para Ki-67, caracterizada pela coloração castanha do núcleo, foi obtida pela média da porcentagem de células coradas por campo analisado. Para cada caso foram contadas pelo menos 1000 células epiteliais em até 10 campos microscópicos consecutivos. Para Bcl-2 e Caspase-3, caracterizados pela marcação citoplasmática, foi obtida a média da porcentagem de área marcada (pixels positivos) em relação à área total do epitélio em cada campo (pixels totais). Todas as contagens foram obtidas com auxílio do software NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland, EUA) (23 - 26).

A análise qualitativa dos marcadores foi realizada a fim de caracterizar o local de marcação de cada anticorpo em relação às camadas constituintes do epitélio de revestimento: basal, suprabasal e superficial. Seguindo os critérios de Kichi et al. (2005), considerou-se camada basal (subentende-se camadas basal e parabasal) aquela de uma a três camadas de células cuboidais ou colunares adjacentes ao tecido conjuntivo fibroso ou membrana basal; camada suprabasal identificada por células relativamente grandes, circulares ou poligonais, entre a camada basal e superficial; e camada superficial contendo células basicamente achatadas adjacente à cavidade cística (22).

Além disso, analisou-se a relação entre o estado funcional do epitélio e os achados imunoistoquímicos dos anticorpos testados. Considerou-se atrófico aquele epitélio pavimentoso estratificado fino e regular, com até 10 camadas de células, com leve a moderado infiltrado inflamatório na cápsula de tecido conjuntivo; e epitélio hiperplásico aquele irregular, com epitélio ondulante de espessura variada, e com severo infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo fibroso adjacente (12, 27).

4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo software EstatsDirect (EstatsDirect Ltd, Chechire, Reino Unido).

As diferenças das frequências de Caspase-3, Ki-67 e Bcl-2 entre os CRs e CDs foram analisadas utilizando o teste t de Student, confirmado pelo teste de Mann-Whitney para resultados não significativos. A relação entre o estado funcional do epitélio e a expressão dos marcadores testados foi analisada pelo teste Qui-quadrado (χ^2).

Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células coradas/ área corada \pm os desvios padrão da média (DPM). Considerou-se valor de $P < 0,05$ para dados com significância estatística.

RESULTADOS

Histopatologia geral

O revestimento epitelial de CRs e CDs revelou vários graus de espessura. Todas as lesões mostraram intensidade variada de infiltrado inflamatório na cápsula de tecido conjuntivo fibroso e, em algumas lesões, foram observadas células inflamatórias infiltradas nos componentes epiteliais (Figura 1). Os CRs apresentaram maior infiltrado inflamatório que os CDs.

Na maioria dos campos analisados dos CRs foram observadas camadas bem definidas do epitélio pavimentoso estratificado, sendo que o número de células da camada superficial foi menor em relação ao das camadas suprabasal e basal. A camada basal consistiu-se basicamente de células colunares, enquanto a camada intermediária foi formada por células poligonais relativamente grandes. Nos CDs, pôde-se observar menor número de células na camada superficial, e maior dificuldade para discriminar células da camada basal e suprabasal, devido a fina espessura do epitélio.

Achados imunoistoquímicos no epitélio de revestimento de cistos radiculares (CRs) e cistos dentígeros (CDs) (Tabela 2)

Bcl-2

A expressão de Bcl-2 foi predominante na camada basal de todas as lesões e foi menor ou ausente na presença de infiltrado inflamatório intenso. A média da porcentagem de área corada para Bcl-2 foi de 0,30% em CRs (Figuras 2A e 2D) e de 1,96% em CDs (Figuras 3A e 3D). A expressão de Bcl-2 no epitélio de CDs, apesar de pequena, foi significativamente maior quando comparada ao epitélio de CRs (teste *t* de Student; $P = 0.04$).

Caspase-3

A expressão de Caspase-3 foi detectada em todas as camadas do epitélio, sendo mais frequente nas camadas suprabasal e superficial do epitélio de CRs (Figuras 2B e 2E) e de CDs (Figuras 3B e 3E). Em alguns dos campos analisados não houve marcação na camada basal. Não houve diferença estatisticamente significativa na positividade para Caspase-3 entre CRs (28,97%) e CDs (29,81%) ($t = 0,23$; $P = 0,82$). Apesar disso, foi possível observar maior expressão desse fator em alguns campos analisados de CRs com intenso infiltrado inflamatório na cápsula conjuntiva.

Ki-67

Foram detectadas células imunopositivas para Ki-67 predominantemente na camada basal do epitélio de CRs (Figuras 2C e 2F) e CDs (Figuras 3C e 3F), e essa expressão foi maior na presença de intenso infiltrado inflamatório. A média da proporção de células coradas foi de 8,64% em CRs e 8,34% em CDs. Não houve diferença estatisticamente significativa na positividade para ki-67 entre CRs e CDs (teste *t* de Student; $P = 0,91$).

Relação entre o estado funcional do epitélio e os achados imunoistoquímicos em CRs e CDs

Em CRs (Figura 2), Caspase-3 e Ki-67 tiveram expressão significativamente maior no epitélio atrófico quando comparado ao hiperplásico, enquanto que a expressão de Bcl-2, mesmo pequena, foi significativamente maior no epitélio atrófico que naquele hiperplásico (teste Qui-quadrado; $P = 0,02$). Em CDs não houve relação significativa entre o estado funcional do epitélio (Figura 3) e a expressão dos fatores Caspase-3, Ki-67 e Bcl-2 (teste Qui-quadrado, $P = 0,67$) (Tabela 3). Também foi observada relação positiva entre a presença de intenso infiltrado inflamatório na cápsula conjuntiva e o epitélio hiperplásico, assim como a ausência ou discreto infiltrado inflamatório associado ao epitélio atrófico .

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra a ocorrência da apoptose e da proliferação celular no epitélio de cistos radiculares (CRs) e de cistos dentígeros (CDs), fenômenos que foram observados em todas as lesões estudadas. Não há trabalhos na literatura indexada demonstrando a frequência de apoptose e proliferação celular, pela comparação imunoistoquímica, no comportamento biológico de cistos odontogênicos inflamatórios (CRs) e de desenvolvimento (CDs).

Sabe-se que o comportamento das lesões inflamatórias depende do balanço entre proliferação e morte celular (28). O antígeno nuclear Ki-67 é considerado um marcador confiável de proliferação celular por estar presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G_1 , S, G_2 e M) e ausente em G_0 (29, 30). Nesse estudo, Ki-67 foi detectado na camada basal de CRs e sua expressão foi significativamente maior no epitélio hiperplásico em relação ao atrófico semelhante aos resultados encontrados por Suzuki et al (31). As células epiteliais, mesmo em condições normais, possuem a característica inata de multiplicação e renovação celular (28). Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o aumento da atividade proliferativa em CRs é influenciado pela presença da inflamação em diferentes intensidades na cápsula de tecido conjuntivo, considerando que cistos revestidos por epitélio hiperplásico são mais inflamados que aqueles revestidos por epitélio atrófico (27, 28, 32).

Apesar do crescimento de CDs ocorrer por acúmulo de fluido, a proliferação celular do revestimento epitelial atua secundariamente na expansão da lesão (5). Em nosso estudo, Ki-67 foi detectado na camada basal de CDs e sua expressão foi similar à detectada em CRs. Acredita-se que a taxa relativamente alta de proliferação celular na camada basal de CDs seja um mecanismo compensado pela apoptose, que ocorre nas demais camadas epiteliais, para manutenção da espessura do revestimento epitelial dessas lesões (5, 22).

A apoptose depende da atividade das caspases, e a expressão de caspase-3 ou CPP32 tem sido considerada essencial para a ativação da morte celular programada (13, 14, 16). Há poucos trabalhos relatando a expressão de caspase-3 nas camadas do epitélio de revestimento de CRs. Dentre todas as caspases humanas identificadas até hoje, caspase-3 é provavelmente, até o momento, a mais indicada para fazer a correlação com a apoptose, por possibilitar a sua detecção nos estágios mais precoces (18, 33).

Embora o presente estudo tenha detectado positividade para caspase-3 em todas as camadas do epitélio de CRs, principalmente nas camadas suprabasal e superficial, outros estudos têm observado a expressão dessa protease apenas na camada superficial (31). Essa divergência parece ser uma consequência da dificuldade metodológica para detecção da apoptose. O preparo correto dos espécimes, o uso de métodos confiáveis para quantificação dos resultados, bem como a aplicação de técnica imunoistoquímica de acordo com as orientações do fabricante permitem maior fidelidade dos dados para comparação com outros estudos. A positividade em todas as camadas epiteliais, com maior frequência nas camadas suprabasal e superficial, corroboram os resultados obtidos por Krajewska et al. (1997), os quais demonstraram a expressão generalizada de caspase-3, sugerindo o importante papel dessa protease na regulação da vida e morte celular em uma variedade

de tipos celulares, incluindo células epiteliais (33). Em nosso trabalho a marcação foi quantificada pela detecção da coloração castanha no citoplasma das células epiteliais. Estudos de revisão indicam que a utilização da caspase-3 em métodos imunoistoquímicos permite detectar precocemente a apoptose, através da utilização de anticorpos monoclonais com marcação citoplasmática (18).

Sabe-se que a apoptose ocorre como mecanismo normal da renovação celular, inclusive no epitélio de revestimento dos cistos (32). Em CDs, nossos resultados demonstraram que a expressão de caspase-3 foi similar àquela encontrada em CRs, sugerindo que a apoptose participa da manutenção da espessura do revestimento epitelial dessas lesões juntamente com a proliferação celular já discutida previamente. Há também evidências de que o aumento da inflamação reflete no aumento da apoptose das células epiteliais em periodontites apicais (34). Essas informações confirmam nossos achados que também demonstraram que a apoptose foi mais evidente no epitélio hiperplásico de CRs, provavelmente como um mecanismo para regular a proliferação epitelial da camada basal estimulada pela maior concentração de infiltrado inflamatório na cápsula de tecido conjuntivo adjacente. Em estudo prévio, Loyola et al. (2005) utilizou 10 CRs com epitélio atrófico e 10 CRs com epitélio hiperplásico para investigar a ocorrência da apoptose através da expressão imunoistoquímica de Bcl-2 e obteve resultados divergentes dos apresentados no presente estudo. Os autores encontraram que a apoptose foi mais frequente em lesões com epitélio atrófico em relação àquelas com epitélio hiperplásico, mas os resultados não foram significativos. A justificativa provável para esses achados foi o número limitado de amostras, que pôde ter resultado em um erro estatístico, inclusive na correlação positiva encontrada entre apoptose e Bcl-2 (12).

Recentemente, tem sido mostrado que a proteína anti-apoptótica Bcl-2 pode evitar o processamento e a ativação de caspase-3, estabilizando a conexão bioquímica entre as proteínas da família Bcl-2 e a família das proteases (33). Bcl-2 age como um supressor da morte celular, mas sem conferir propriedade proliferativa ao tecido, constituindo uma das vias mais comuns da tumorigênese (29). A supressão da apoptose reflete na sobrevida celular e aumenta o risco das células adquirirem outras mudanças, como anormalidades cromossômicas e infecções virais, resultando em transformação maligna ou progressão tumoral (35). A superexpressão dessa proteína tem sido relatada em muitos tumores humanos, inclusive no tumor odontogênico ceratocístico, classificado como uma lesão cística tumoral devido seu comportamento biológico agressivo, caracterizado pela intensa proliferação celular e manutenção da sobrevida celular (5, 22).

Em nosso estudo, a detecção de Bcl-2, apesar de fraca e exclusiva à camada basal, foi significativamente maior em CDs quando comparada aos CRs. Acredita-se que a expressão dessa proteína seja afetada pelo processo inflamatório presente primariamente em CRs, resultando inclusive na sua relação mais significativa com epitélios atróficos. Em CDs, Kichi et al. (2005) encontrou dados semelhantes, propondo que Bcl-2 pode funcionar como um fator patógeno nessas lesões, afetando não só as reações apoptóticas da camada basal, mas também os componentes epiteliais da proliferação celular (22).

A relação entre a proliferação epitelial e a presença de inflamação nos cistos radiculares é bem estabelecida (2, 28, 32). Considerando que a privação de fatores de crescimento, como as citocinas dos processos inflamatórios, estimula as células a entrar em apoptose, é esperado que a

utilização de um protocolo antimicrobiano criterioso durante o tratamento endodôntico implique no desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular do revestimento epitelial dos cistos odontogênicos inflamatórios, resultando possivelmente no reparo dos tecidos periapicais.

Em conclusão, este estudo confirma que a apoptose ocorre naturalmente em todas as camadas epiteliais como um mecanismo de renovação juntamente com a proliferação celular. Nossos achados demonstram a relação direta entre apoptose e proliferação celular no controle da espessura do revestimento epitelial de origem odontogênica, e consequentemente, na manutenção de cistos radiculares e dentígeros. Embora não tenha havido diferença significativa entre as lesões estudadas, a apoptose e a proliferação celular ocorreram mais intensamente no epitélio hiperplásico de cistos radiculares e dentígeros, relacionados à presença de intenso infiltrado inflamatório na cápsula. Além dessa relação, pôde-se observar que a proteína Bcl-2 foi significativamente mais frequente na camada basal de cistos dentígeros, principalmente em áreas atróficas, justificando a inibição de sua expressão diante da presença de infiltrado inflamatório mais severo na cápsula de cistos radiculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nair PN. New perspectives on radicular cysts: do they heal? *Int Endod J*. 1998 May; 31(3):155-60. Review.
2. Lin LM, Huang GT, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod*. 2007 Aug; 33(8):908-16. Epub 2007 Apr 2. Review.
3. Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Jan; 81(1):93-102.
4. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004, 15(6):348-381.
5. Mateus GCP, Lanza GHSP, Moura PHR, Marigo HA, Horta MCR. Cell proliferation and apoptosis in keratocystic odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Nov 1; 13(11):E697-702.
6. Edamatsu M, Kumamoto H, Ooya K, Echigo S. Apoptosis-related factors in the epithelial components of dental follicles and dentigerous cysts associated with impacted third molars of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Jan; 99(1):17-23.
7. Estrela C. *Ciência Endodôntica*. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2004. 1010p.
8. Soares J, Santos F, Silveira F, Nunes E. Nonsurgical treatment of extensive cyst-like periapical lesion of endodontic origin. *Int Endod J* 2006; 39: 566-575.
9. Siqueira JF, Rôcas IN, Riche FNSJ, Provenzano JC. Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106 (5): 757-62.
10. Catanzaro-Guimarães SA, Alle N. Observations on the structure and pathogenesis of apical periodontal cyst (author's transl). *Estomatol Cult*. 1973 Jul-Dec; 7(2):196-201.
11. Rocha MCJ (1991) Estudo microscópico e imunohistoquímico dos cistos periodontais apicais de dentes tratados ou não endodonticamente. Tese (Doutorado em Patologia Bucal), São Paulo, Bauru: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 152f.
12. Loyola AM, Cardoso SV, Lisa GS, Oliveira LJ, Mesquita RA, Carmo MA, Aguiar MC. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. *Int Endod J*. 2005 Jul; 38(7):465-9.
13. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran: *Patologia: Bases Biológicas das Doenças*. 7 ed. Elsevier; 2005. 1504p.
14. Doonan F, Cotter TG. Morphological assessment of apoptosis. *Methods*. 2008 Mar; 44(3):200-4.
15. Bortner CD, Cidlowski JA. Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death. *J Biol Chem*. 2003 Oct 3; 278(40):39176-84.
16. Lawen A. Apoptosis - an introduction. *BioEssays*. 2003 Sep; 25 (9):888-896.
17. Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*. 2008 Mar; 44(3):262-72. Review.

18. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res*. 2007 May 1; 139(1):143-56.
19. Bran GM, Stern-Straeter J, Hörmann K, Riedel F, Goessler UR. Apoptosis in bone for tissue engineering. *Arch Med Res*. 2008 Jul; 39(5):467-82.
20. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35: 495-516.
21. Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas G, Androutsos G. A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkol*. 2008; 31:702-706.
22. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, Shimono M. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic Keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34: 280-6.
23. Dias FC (2008) Uso do software ImageJ para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais. Dissertação (Mestrado do Curso de Pós-graduação em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores), São Paulo, São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), 148f. Disponível em: < <http://mtc-m17.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/mtc-m17@80/2008/04.30.20.23/doc/publicacao.pdf> >. Acesso em 19 de mai. 2009.
24. Rasband W. Image J documentation. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>>. Acesso em 19 de mai. 2009.
25. Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick CW Jr. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J Histochem Cytochem*. 2003; 51(5):575-84.
26. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopatol*. 2006; 49: 406-10.
27. Cury VC, Sette OS, Silva JV, Araújo VC, Gómez RS. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. *J Endod*. 1998; 24: 36-7.
28. Takahashi K, MacDonald D, Murayama Y, Kinane D. Cell synthesis, proliferation and apoptosis in human dental periapical lesions analysed by in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Oral Dis*. 1999 Oct; 5(4):313-20.
29. Tosios KI, Kakarantza-Angelopoulou E, Kapranos N. Immunohistochemical study of bcl-2 protein, Ki-67 antigen and p53 protein in epithelium of glandular odontogenic cysts and dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med*. 2000 Mar; 29(3):139-44.
30. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopatol*. 1990; 17(6):489-503.
31. Suzuki T, Kumamoto H, Kunimori K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med*. 2005 Jan; 34(1):46-52.
32. Lin LM, Ricucci D, Lin J, Rosenberg P. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. *J Endod*. 2009; 35(5): 607-15
33. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res*. 1997 Apr 15; 57(8):1605-13.

34. Satchell PG, Gutmann JL, Witherspoon DE. Apoptosis: an introduction for the endodontist. *Int Endod J*. 2003 Apr; 36(4):237-45.
35. Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol*. 1996 Feb; 27(2):102-10. Review.

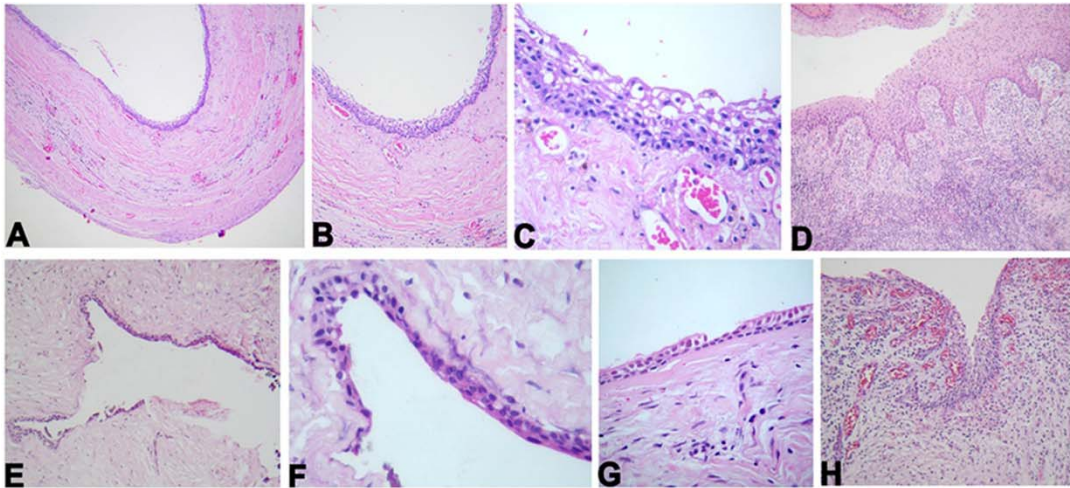


Figura 1 A) Cisto radicular (HE, 50x); B) Maior aumento de A, mostrando a espessura do revestimento epitelial e a cápsula de tecido conjuntivo fibroso (HE, 100x); C) Maior aumento de B, mostrando o epitélio de revestimento pavimentoso estratificado (HE, 400x); D) Cisto radicular, demonstrando epitélio hiperplasiado por acantose, associado a intenso infiltrado inflamatório na cápsula (HE, 400x); E) Cisto dentígero (HE, 100x); F) Maior aumento de E mostrando epitélio de revestimento aplásico (HE, 400x); G) Epitélio de revestimento de cisto dentígero, semelhante ao epitélio reduzido do órgão do esmalte (HE, 400x); H) Cisto dentígero, demonstrando epitélio hiperplasiado por acantose, associado a intenso infiltrado inflamatório na cápsula (HE, 400x).

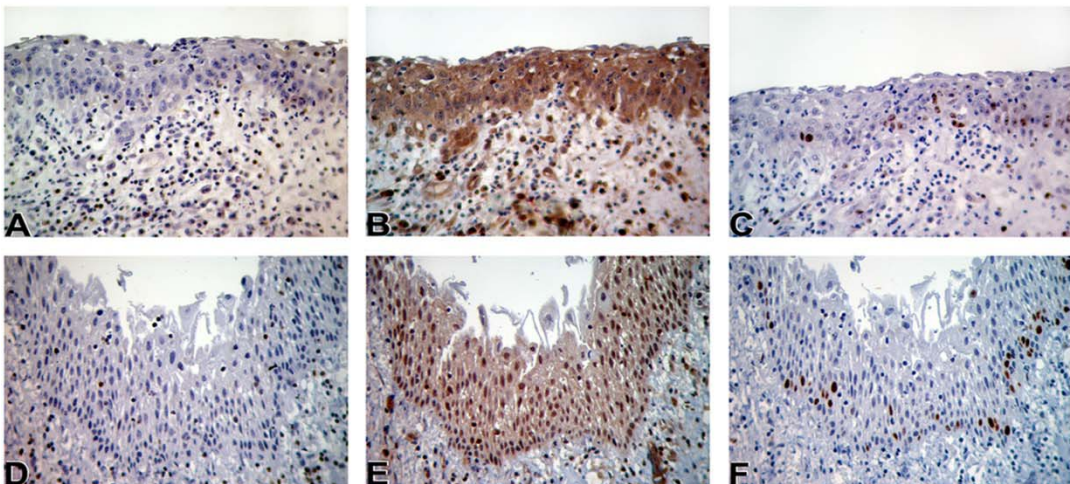


Figura 2 Cisto Radicular (LSAB, 400x): A) Expressão citoplasmática de Bcl-2 nas células da camada basal de epitélio atrófico; B) Expressão citoplasmática de Caspase-3 nas células das camadas basal, suprabasal e superficial de epitélio atrófico; C) Expressão nuclear de Ki-67 nas células basais de epitélio atrófico; D) Expressão citoplasmática de Bcl-2 nas células da camada basal de epitélio hiperplásico; E) Expressão citoplasmática de Caspase-3 nas células das camadas basal, suprabasal e superficial de epitélio hiperplásico; F) Expressão nuclear de Ki-67 nas células basais de epitélio hiperplásico.

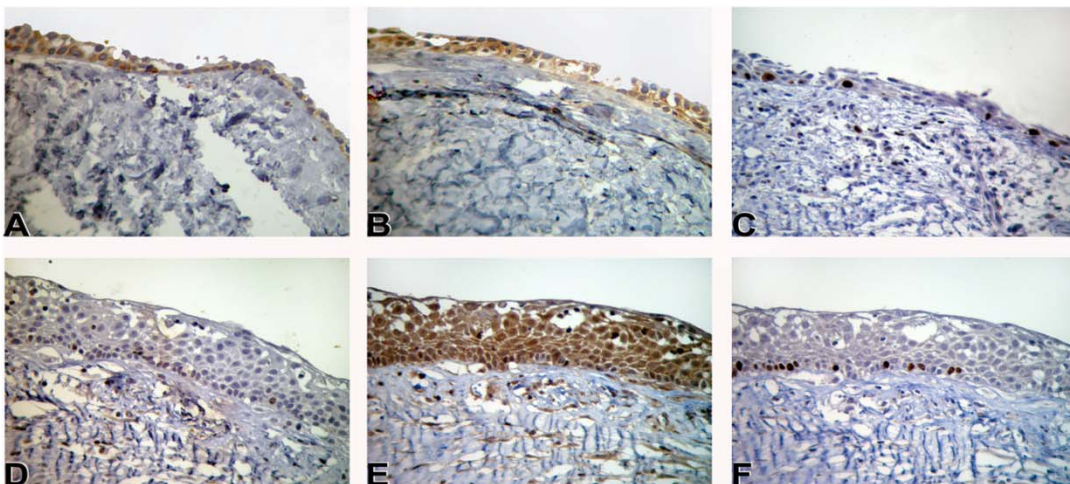


Figura 3 Cisto Dentígero (LSAB, 400x): A) Expressão citoplasmática de Bcl-2 nas células da camada basal de epitélio atrófico; B) Expressão citoplasmática de Caspase-3 em epitélio atrófico; C) Expressão nuclear de Ki-67 nas células basais de epitélio atrófico; D) Expressão citoplasmática de Bcl-2 nas células da camada basal de epitélio hiperplásico; E) Expressão citoplasmática de Caspase-3 nas células das camadas basal, suprabasal e superficial de epitélio hiperplásico; F) Expressão nuclear de Ki-67 nas células basais de epitélio hiperplásico.

Tabela 1 Anticorpos primários utilizados nos estudos imunoistoquímicos.

| Anticorpo Primário | Clonalidade | Diluição | Fonte |
|----------------------------|-------------|----------|--------------------------------------|
| Caspase-3 (CPP32) | Monoclonal | 1: 200 | Novocastra, Benton Lane, Inglaterra |
| Ki-67 (Clone MIB-1) | Monoclonal | 1: 300 | Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca |
| Proteína Bcl-2 (Clone 124) | Policlonal | 1: 200 | Novocastra, Benton Lane, Inglaterra |

Tabela 2 Achados imunoistoquímicos dos fatores estudados no epitélio de revestimento de cistos radiculares (CRs) e cistos dentígeros (CDs)

| | Caspase-3 | Ki-67 | Bcl-2 |
|---------------------|---------------|-------------|--------------|
| CRs (n = 17) | 28,97 ± 7,54 | 8,64 ± 6,43 | 0,30 ± 0,63 |
| CDs (n = 9) | 29,81 ± 10,99 | 8,34 ± 6,44 | 1,96 ± 3,07* |
| P | P = 0,8205 | P = 0,9100 | P = 0,0404 |

Teste *t* de Student

Significância estatística: * P < 0,05

Valores expressos como média ± desvio-padrão (%)

Tabela 3: Relação da atividade funcional do epitélio de CRs e CDs e os achados imunoistoquímicos através do número de campos analisados.

| | CRs | | | CDs | | |
|------------------------|-----------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | Caspase-3 | Ki-67 | Bcl-2 | Caspase-3 | Ki-67 | Bcl-2 |
| Atrófico | 134 | 97 | 151* | 82 | 70 | 85 |
| Hiperplásico | 36* | 26* | 19 | 8 | 5 | 5 |
| Total de campos | 170 | 123 | 170 | 90 | 75 | 90 |

Teste χ^2

Significância estatística: * P < 0,05

**Immunohistochemical detection of related factors to cellular proliferation and apoptosis
mechanism in radicular and dentigerous cysts.**

Caroline Alberici Martins, DDS^a; Elena Riet Correa Rivero, DDS, MSD, PhD^b

^a Post-graduate student in Endodontics, School of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^b Professor of Pathology, School of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Corresponding author: Elena Riet Correa Rivero
Department of Pathology, Center of Health Sciences
Federal University of Santa Catarina, University Campus – Trindade - Florianópolis
88.040-370 – SC – Brazil
Phone: +55 48 37215068
e-mail: riet@ccs.ufsc.br

Abstract

This study proposed to investigate aspects of proliferation and cell death in the epithelium of radicular (RCs) and dentigerous (DCs) cysts. Serial sections of 17 RCs and nine DCs were prepared for immunohistochemical detection of antigens Caspase-3, Bcl-2 and cellular proliferation marker Ki-67 by streptavidin-biotin-peroxidase assay. Caspase-3 was detected mainly in the suprabasal and superficial epithelial cells of RCs and DCs, while Ki-67 was detected predominantly in the basal layer. Both markers had significant expression in hyperplastic epithelium, related to the intense inflammation in the capsule. The immunoreactivity for Bcl-2 was exclusive to basal layer and was significantly higher in aplastic epithelium of DCs than RCs. These results suggest that epithelial proliferation is balanced by apoptosis, and that the presence of inflammation inhibits the expression of Bcl-2. The dentigerous and radicular cysts have different mechanisms of formation, but have similar biological behavior before the presence of intense inflammatory infiltrate.

Keywords: apoptosis, cell proliferation, dentigerous cyst, immunohistochemistry, radicular cyst.

Introduction

The apical periodontitis is caused by the progressive colonization of microorganisms and their products in periapical tissues from infection and necrosis of the pulp, often due to dental caries (1, 2). The root cysts are most common of the maxillary cysts and represent 6% to 55% of apical periodontitis (3). Its formation is associated with activation and proliferation of epithelial rests of Malassez by inflammatory stimulus (2, 4). Another very common cyst is the dentigerous cyst, formed by the accumulation of fluid between the crown of an included tooth and the reduced epithelium of the enamel organ (5, 6). Once formed, the cysts can grow by different mechanisms, including accumulation of fluid and epithelial proliferation regulated by molecular mechanisms (1, 4).

Many professionals prefer the surgical removal of lesions radiographically compatible with radicular cysts (7). However, studies have shown success rates between 85% - 95% of lesions radiographically compatible with radicular cysts noticed after endodontic treatment of involved teeth (1, 8, 9). Biologically there are many hypotheses to explain the mechanisms of repair after endodontic therapy. The epithelial cells of the lining of the cysts may stop proliferating because of reduction of inflammatory mediators, growth factors and cytokines (10). Moreover, the absence of growth factors and / or the presence of the death signals induce apoptosis, which participates in the control of cell survival. The lack of favorable environmental factors in the tissue and the presence of apoptosis prevent cell proliferation, and consequently the growth of the lesion (11, 12).

Apoptosis is a highly regulated intracellular program, in which cells destined to die activate enzymes that degrade the nuclear DNA and proteins responsible for cell architecture. In this process, the cell membrane remains intact and apoptotic bodies containing organelles dense and compressed, with or without the presence of genetic material, are rapidly removed by macrophages or by non-professional phagocytes. Thus, the apoptosis, differently from necrosis, is described as a cleaning process by preventing the release of toxic cell contents which trigger the inflammatory process (13 - 16). The cells have many apoptotic biochemical changes, which are the basis of structural changes. A characteristic aspect is the hydrolysis of proteins involved in activation of caspases (14, 17, 18). The caspases are functionally divided into initiators and effector caspases, classified according to the order of activation of these enzymes during apoptosis. The caspase-3 is an example of the effector and its expression is critical for the activation of the process (17 - 19).

The initiation of apoptosis occurs mainly through two way, the extrinsic pathway or death receptor and intrinsic or mitochondrial, that converge to activate the caspases (18, 20). The extrinsic pathway is initiated by activation of death receptors on cell as TNFR1 and Fas protein, members of the family of receptors tumor necrosis factor (TNF) (13, 21). Already the intrinsic pathway is the result of increased mitochondrial permeability and release of pro-apoptotic molecules in the cytoplasm, such as cytochrome c. Growth factors and other signals survival stimulate production of the antiapoptotic protein Bcl-2 family (B-cell lymphoma protein 2). This family consists of a group of more than 20 proteins, whose function is to regulate apoptosis (19, 21). The Bcl-2 is a major antiapoptotic protein, normally located in the mitochondrial membrane and in the

cytoplasm and promoting cell survival (16). When activated prevents the release of cytochrome c prolonging the survival cell without conferring proliferative advantage (14, 22).

In literature there is no knowledge of indexed studies comparing the biological mechanisms of the formation, growth and regression of radicular and dentigerous cysts, in which cell proliferation and apoptosis are directly involved. The claim of the existing work is that apoptosis participates in the population control of epithelial cells, but remains unclear the relationship of this mechanism with the different cell layers of the epithelium lining the cysts and their functional status. Furthermore, reports of high rates of repair of lesions compatible with radicular cysts by endodontic therapy address the clinical and radiographic features, but without considering the biological aspects that are more complex and relevant. The aim of this study was to contribute to characterization of related factors to proliferation and cell death in epithelial linings of radicular and dentigerous cysts in different functional states, by means of immunohistochemical detection of related proteins to apoptosis, Bcl-2 and caspase-3, and the cell proliferation marker Ki-67.

Materials and Methods

Selection of cases and tissue preparation

This study was approved by the Ethics Committee in Human Research of the UFSC, protocol 017/09 FR 241392.

Were pre-selected 20 cases of radicular cysts and 20 of dentigerous cysts from bank tissue blocks prepared by the Laboratory of Oral Pathology (LPB), Federal University of Santa Catarina (UFSC), on routine histopathologic examination performed between the periods of 2006 - 2009, in patients older than 18 years. All specimens were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin wax, and had at least one blade mounted on histologic section stained by haematoxylin and eosin (HE). As criteria for inclusion was considered the good condition of conservation of blocks and the presence of epithelial lining of the microscopic analysis of slides stained by HE (increase of 10X) of at least 3 / 4 of the lesion. In the end, it was obtained a sample of 17 radicular cysts and nine dentigerous cysts.

Immunohistochemistry

For all antibodies used in this study, the specimens were submitted to immunohistochemistry technique by the streptavidin-biotin immuno-peroxidase method (LSAB). The technical procedures were performed in the Service of Pathological Anatomy (SAP) of University Hospital (HU) of UFSC, following the standardized protocol for the same. Serial tissue sections from 3µm thick, mounted on slides prepared with ATPS solution of (3-aminopropyltriethoxysilene, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) at 5% in acetone, were deparaffinized in xylene and hydrated in decreasing series of ethanol.

Prior to incubation with primary serum, sections were immersed in 3% hydrogen peroxide to eliminated endogenous peroxidase activity. Subsequently, the slides were washed in distilled water and boiled in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) (Merk, São Paulo / SP, Brazil) for 45 minutes for retrieval antigenic. After washing in distilled water, sections were immersed in phosphate buffer saline (PBS) 10mM, pH 7.2-7.4 (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA). We used antibodies from mouse anti-human antigens for detection of Bcl-2, Ki-67 and caspase-3 ([Table 1](#)), using a slice for each tissue reaction. The incubation was obtained by adding the primary antibody solution, diluted according to manufacturer's guidelines on the tissue sections and slides were kept in a moist chamber between 2-8°C overnight. After, was done two washing in PBS for 5 minutes each at room temperature, followed by incubation with secondary antibody biotinylated anti-IgG conjugated with a polymer of peroxidase (EN VISION PLUS, Dako Cytomation, Denmark) ready for use , for one hour in a moist chamber at room temperature. After the incubation period, samples were washed twice in PBS for 5 minutes each at room temperature.

The detection of the immunohistochemical reaction was achieved by immersing the samples for 3-5 minutes in chromogen solution containing 0.03% of 3,3'-diaminobenzindina (DAB) previously diluted in imidazole buffer pH 7.2 and hydrogen peroxide to 0.3 % (Dako, Glostrup, Denmark). The counterstained was obtained by immersing the slides in Harris's haematoxylin. Finally, the sections were dehydrated in crescent series of ethanol, cleared in xylene, and mounted in Entellan® (Merck,

Darmstadt, Germany). The negative control for each case was obtained by omission of the primary antibody reactions and for positive control was used a case of lymphnode. The positive result was observed by the presence of brown staining marking the site of the antibodies.

Analysis immunohistochemistry

The slides were examined with a light microscope (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with digital camera (Cannon A620) added in a final magnitude of 400X. The immunoreactivity for Ki-67, characterized by the brown coloration of nucleus, was defined as the mean ratio of positive cells among 1000 epithelial cells in up to 10 randomly consecutive microscopic fields. For Bcl-2 and Caspase-3, characterized by cytoplasmic marker, was obtained the average percentage of the marked area (positive pixels) in relation to the total area of epithelium in each field (total pixels). All counts were obtained using NIH ImageJ 1.36b software (National Institutes of Health, Maryland, USA) (23 - 26).

The qualitative analysis of the markers was performed to characterize the site of labeling of each antibody on the constituent layers of epithelium: basal, suprabasal and superficial. Following the criteria of Kichi et al. (2005), it was basal layer (it is understood parabasal and basal layers) of one to three layers of cuboids or columnar cells adjacent to the fibrous connective tissue or basement membrane; suprabasal layer identified by cells relatively large, circular or polygonal, between the basal layer and superficial, and surface layer containing cells basically flat adjacent to the cystic cavity (22). In addition, was examined the relationship between the functional status of the epithelium and immunohistochemical findings of the antibodies tested. It was considered atrophic that stratified squamous epithelium and thin, regular, with up to 10 layers of cells, usually with mild to moderate inflammatory infiltrate in the capsule of connective tissue, and hyperplastic epithelium that irregular, undulating, of variable thickness and with severe inflammatory infiltrate in the adjacent fibrous connective tissue (12, 27).

Analysis statistics

The data were analyzed by software EstatsDirect (EstatsDirect Ltd, Chechire, UK). The differences in percentages of positive cases for Caspase-3, Ki-67 and Bcl-2, between the RCs and DCs, was determined by Student *t* test, confirmed by Mann-Whitney test for non-significant results, while the relationship between the functional status of the epithelium and the expression of the tested markers was analyzed by Chi-square (χ^2). The results were expressed as mean percentage of stained cells / stained area \pm standard deviation of the mean (SDM). *P* values less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Histopathology general

The epithelial lining of RCs and DCs showed various degrees of thickness. All lesions showed varying intensity of inflammatory infiltrate in the capsule of fibrous connective tissue and in some lesions, inflammatory cells were infiltrated in epithelial components (Figure 1). The RCs showed greater inflammatory infiltrate than DCs. In RCs, the most fields examined showed layers well defined of stratified pavement epithelium, and the number of cells in the surface layer was lower on the basal and suprabasal layers. The basal layer was mainly consisted of columnar cells, while the intermediate layer was formed by relatively large polygonal cells. In DCs, it was observed lower number of cells in the surface layer, and more difficult to discriminate cells of the basal layer and suprabasal due to thin thickness of the epithelium.

Immunohistochemical findings in the epithelium lining of radicular cysts (RCs) and dentigerous cysts (DCs) (Table 2)

Bcl-2

The immunoreactivity for Bcl-2 was predominant in the basal layer of all lesions analyzed and was lower or absent in the presence of intense inflammatory infiltrate. The average percentage of area stained for Bcl-2 was 0.30% in RCs (Figures 2A and 2D) and 1.96% in DCs (Figures 3A and 3D). The expression of Bcl-2 in the epithelium of DCs, although small, was significantly higher when compared to the epithelium of RCs (Student *t* test, $P = 0.04$).

Caspase-3

The expression of Caspase-3 was detected in all layers of the epithelium, but was more frequent in the suprabasal and superficial layers of the epithelium of RCs (Figures 2B and 2E) and DCs (Figures 3B and 3E). In some fields examined were not observed marking in the basal layer. There was no statistical significantly difference in positivity to Caspase-3 between RCs (28.97%) and DCs (29.81%) ($t = 0.23$, $P = 0.82$). Nevertheless, it was possible to observe increased expression of this factor in some fields of RCs with intense inflammatory infiltrate in conjunctiva capsule.

Ki-67

Immunoreactivity for Ki-67 was detected predominantly in nucleus of epithelial cells of the basal layer of RCs (Figures 2C and 2F) and DCs (Figures 3C and 3F), and its expression was higher in the presence of intense inflammatory infiltrate. The average proportion of stained cells was 8.64% in RCs and 8.34% in DCs. There was not statistically significant differences in positivity for Ki-67 between RCs and DCs (Student *t* test, $P = 0.91$).

Relationship between the functional status of the epithelium and immunohistochemical findings in the RCs and DCs

In RCs (Figure 2), Caspase-3 and Ki-67 expression were significantly higher in atrophic epithelium than hyperplastic, whereas the expression of Bcl-2, even small, was significantly higher in atrophic than hyperplastic epithelium (Chi-square, $P = 0.02$). In DCs there was not significant relationship between the functional status of the epithelium (Figure 3) and the expression of factors Bcl-2, Caspase-3 and Ki-67 (Chi-square test, $P = 0.67$). There was positive relationship between the presence of intense inflammatory infiltrate in the conjunctiva capsule and the hyperplastic epithelium, and absent or mild inflammatory infiltrate associated with epithelial atrophic (Figure 1).

Discussion

This study demonstrated the occurrence of apoptosis and cell proliferation in the epithelium of radicular cysts (RCs) and dentigerous cysts (DCs), phenomena that were observed in all lesions studied. There is no work in the indexed literature showing the frequency of apoptosis and cell proliferation, by immunohistochemical comparison, related with the biological behavior in inflammatory (RCs) and development (DCs) odontogenic cysts.

It is known that the behavior of inflammatory lesions depends of the balance between cell proliferation and death (28). The nuclear antigen Ki-67 is considered a reliable marker of cell proliferation, which is present in all active phases of the cell cycle (G1, S, G2 and M) and absent in G0 (29, 30). In this study, Ki-67 was detected in the basal layer of RCs and its expression was significantly higher in hyperplasic epithelium in relation to aplasic, similar to results found by Suzuki et al (31). The data obtained in this study suggest that the increased proliferative activity in RCs is influenced by the presence of inflammation in different intensities in the capsule of connective tissue, whereas cysts lined by hyperplasic epithelium are more inflamed than those covered by aplasic epithelium (27, 28, 32).

Despite the growth of DCs occurs by accumulation of fluid between the crown of unerupted or impacted teeth and remaining of reduced enamel epithelium, the cell proliferation of the epithelial lining acts secondarily in the expansion of the lesion (5). In our study, Ki-67 was detected in the basal layer of DCs and their expression was similar to that found in RCs. It is believed that the relatively high rate of cell proliferation in the basal layer of DCs is a mechanism compensated by apoptosis, which occurs in other epithelial layers, to maintain the thickness of the epithelial lining of these lesions (5, 22).

The apoptosis depends of caspase's activity and the expression of caspase-3 or CPP32 has been considered essential for the activation of programmed cell death (14, 16). There are few studies reporting the expression of caspase-3 in the epithelial layers of the RCs. Among all human caspases identified to date, caspase-3 is probably so far, the best way to make the correlation with apoptosis, by enabling its detection in early stages (18, 33).

Although this study has found positivity for caspase-3 in all layers of the epithelium of RCs, mainly in the suprabasal and superficial layers, other studies have observed its expression only in the surface layer (31). This difference seems to be a consequence of methodological difficulties to detect apoptosis. The correct preparation of the specimens, the use of reliable methods for quantification of results and the application of immunohistochemistry technique in accordance with the guidelines of the manufacturer provide greater fidelity of the data for comparison with other studies. The positivity in all epithelial layers, with greater frequency in the suprabasal and superficial layers, corroborate the results obtained by Krajewska et al. (1997), which demonstrated the widespread expression of caspase-3, suggesting the important role of this protease in the regulation of life and cell death in a variety of cell types, including epithelial cells (33). In our work the marking was measured by detecting the color brown in the cytoplasm of epithelial cells. Review of studies indicate that the use of caspase-

3 in immunohistochemical methods provide to detect the early apoptosis, through the use of monoclonal antibodies with cytoplasmic marker (18).

It is known that apoptosis occurs as a normal mechanism of cell renewal, including the epithelium lining of the cysts (32). In DCs, our results showed that the expression of caspase-3 was similar to that found in RCs, suggesting that apoptosis participates in the maintenance of the thickness of the epithelial lining of these lesions along with the cell proliferation, which was discussed previously. There is also evidence that increased inflammation reflected in increased apoptosis of epithelial cells in apical periodontitis (34). This information confirms our findings that also showed apoptosis was more evident in the epithelium of hyperplastic RCs, probably as a mechanism to regulate the epithelial proliferation of basal layer stimulated by the increased concentration of inflammatory infiltrate in the adjacent connective tissue capsule. In a previous study, Loyola et al. (2005) used 10 RCs with atrophic epithelium and 10 RCs with hyperplastic epithelium to investigate the occurrence of apoptosis by immunohistochemical expression of Bcl-2 and obtained results different from those presented in this study. The authors found that apoptosis was more frequent in lesions with atrophic epithelium in relation to those with hyperplastic epithelium, but the results were not significant. The likely explanation for these findings was the limited number of samples, which could have resulted in a statistical error, including the positive correlation found between apoptosis and Bcl-2 (12).

Recently, it has been shown that the anti-apoptotic protein Bcl-2 may prevent processing and activation of caspase-3, stabilizing the biochemical connection between the Bcl-2 family and the family of proteases (33). Bcl-2 acts as a suppressor of cell death, but without giving the property proliferative tissue, is one of the most common means of tumorigenesis (29). The suppression of apoptosis reflected in cell survival and increases the risks of the cells acquire other changes such as chromosomal abnormalities and viral infections, resulting in malignant transformation or tumor progression (35). The overexpression of this protein has been reported in many human cancers, including in keratocystic odontogenic tumor, classified as a tumor because its aggressive biological behavior, characterized by intense cell proliferation and maintenance of cell survival (5, 22).

In our study, the detection of Bcl-2, despite the weak and only in the basal layer, was significantly higher in DCs than RCs. It is believed that the expression of this protein is affected by this inflammatory process primarily in RCs, resulting in their relationship even more significant with aplastic epithelium. In DCs, Kichi et al. (2005) found similar data, suggesting that Bcl-2 can function as a factor pathogen in these injuries, affecting not only the apoptotic reactions of basal layer, but also the epithelial components of cell proliferation (22).

The relationship between epithelial proliferation and the presence of inflammation in radicular cysts is well established (8, 28, 32). Whereas deprivation of growth factors, as cytokines from inflammatory processes, stimulates cells to enter apoptosis, it is expected that the use of a rigorous antimicrobial protocol for endodontic treatment influences at the balance between proliferation and cell death of the epithelial lining of inflammatory odontogenic cyst, possibly resulting in the repair of periapical tissues.

In conclusion, this study confirmed that apoptosis occurs naturally in all epithelial layers as a mechanism for renewal along with cell proliferation. Our findings demonstrated the direct relationship

between apoptosis and cell proliferation in the control of the thickness of the epithelial lining of odontogenic origin, and therefore in maintenance of radicular and dentigerous cysts. Although there was no significant difference between the lesions studied, the apoptosis and cell proliferation occurred more intensely in hyperplastic epithelium of radicular and dentigerous cysts, related to the presence of intense inflammatory infiltrate in the capsule. In addition to this relationship, it was observed that the protein Bcl-2 was significantly more frequent in the basal layer of dentigerous cysts, especially in atrophic areas, justifying the inhibition of expression before the presence of more severe inflammatory infiltrate in the capsule of radicular cysts.

References

1. Nair PN. New perspectives on radicular cysts: do they heal? *Int Endod J*. 1998 May; 31(3):155-60. Review.
2. Lin LM, Huang GT, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod*. 2007 Aug; 33(8):908-16. Epub 2007 Apr 2. Review.
3. Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Jan; 81(1):93-102.
4. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004, 15(6):348-381.
5. Mateus GCP, Lanza GHSP, Moura PHR, Marigo HA, Horta MCR. Cell proliferation and apoptosis in keratocystic odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Nov 1; 13(11):E697-702.
6. Edamatsu M, Kumamoto H, Ooya K, Echigo S. Apoptosis-related factors in the epithelial components of dental follicles and dentigerous cysts associated with impacted third molars of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Jan; 99(1):17-23.
7. Estrela C. *Ciência Endodôntica*. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2004. 1010p.
8. Soares J, Santos F, Silveira F, Nunes E. Nonsurgical treatment of extensive cyst-like periapical lesion of endodontic origin. *Int Endod J* 2006; 39: 566-575.
9. Siqueira JF, Rôcas IN, Riche FNSJ, Provenzano JC. Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106 (5): 757-62.
10. Catanzaro-Guimarães SA, Alle N. Observations on the structure and pathogenesis of apical periodontal cyst (author's transl). *Estomatol Cult*. 1973 Jul-Dec; 7(2):196-201.
11. Rocha MCJ (1991) Estudo microscópico e imunohistoquímico dos cistos periodontais apicais de dentes tratados ou não endodonticamente. Tese (Doutorado em Patologia Bucal), São Paulo, Bauru: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 152f.
12. Loyola AM, Cardoso SV, Lisa GS, Oliveira LJ, Mesquita RA, Carmo MA, Aguiar MC. Apoptosis in epithelial cells of apical radicular cysts. *Int Endod J*. 2005 Jul; 38(7):465-9.
13. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran: *Patologia: Bases Biológicas das Doenças*. 7 ed. Elsevier; 2005. 1504p.
14. Doonan F, Cotter TG. Morphological assessment of apoptosis. *Methods*. 2008 Mar; 44(3):200-4.
15. Bortner CD, Cidlowski JA. Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death. *J Biol Chem*. 2003 Oct 3; 278(40):39176-84.
16. Lawen A. Apoptosis - an introduction. *BioEssays*. 2003 Sep; 25 (9):888-896.
17. Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*. 2008 Mar; 44(3):262-72. Review.

18. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepetz S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res.* 2007 May 1; 139(1):143-56.
19. Bran GM, Stern-Straeter J, Hörmann K, Riedel F, Goessler UR. Apoptosis in bone for tissue engineering. *Arch Med Res.* 2008 Jul; 39(5):467-82.
20. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35: 495-516.
21. Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas G, Androutsos G. A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkol.* 2008; 31:702-706.
22. Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, Shimono M. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic Keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34: 280-6.
23. Dias FC (2008) Uso do software ImageJ para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais. Dissertação (Mestrado do Curso de Pós-graduação em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores), São Paulo, São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), 148f. Disponível em: < <http://mtc-m17.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/mtc-m17@80/2008/04.30.20.23/doc/publicacao.pdf> >. Acesso em 19 de mai. 2009.
24. Rasband W. Image J documentation. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>>. Acesso em 19 de mai. 2009.
25. Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick CW Jr. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51(5):575-84.
26. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopatol.* 2006; 49: 406-10.
27. Cury VC, Sette OS, Silva JV, Araújo VC, Gómez RS. Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. *J Endod.* 1998; 24: 36-7.
28. Takahashi K, MacDonald D, Murayama Y, Kinane D. Cell synthesis, proliferation and apoptosis in human dental periapical lesions analysed by in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Oral Dis.* 1999 Oct; 5(4):313-20.
29. Tosios KI, Kakarantza-Angelopoulou E, Kapranos N. Immunohistochemical study of bcl-2 protein, Ki-67 antigen and p53 protein in epithelium of glandular odontogenic cysts and dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med.* 2000 Mar; 29(3):139-44.
30. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopatol.* 1990; 17(6):489-503.
31. Suzuki T, Kumamoto H, Kunimori K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005 Jan; 34(1):46-52.
32. Lin LM, Ricucci D, Lin J, Rosenberg P. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. *J Endod.* 2009; 35(5): 607-15
33. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.* 1997 Apr 15; 57(8):1605-13.

34. Satchell PG, Gutmann JL, Witherspoon DE. Apoptosis: an introduction for the endodontist. *Int Endod J*. 2003 Apr; 36(4):237-45.
35. Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol*. 1996 Feb; 27(2):102-10. Review.

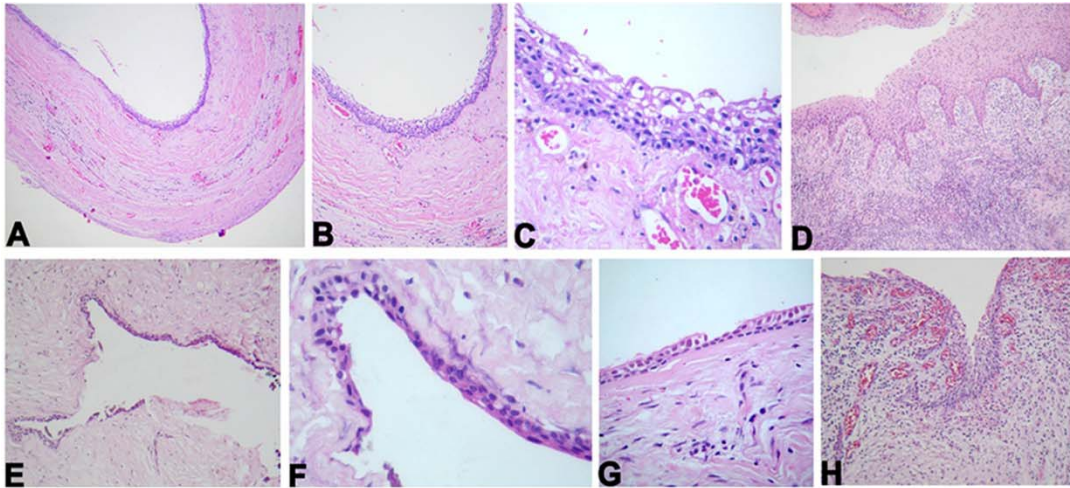


Figure 1 A) Radicular cyst (HE, 50X); B) Higher magnification of A, showing thickness of the epithelial lining and the fibrous connective tissue of capsule (HE, 100X); C) Higher magnification of B showing the stratified squamous epithelium (HE, 400X); D) Radicular cyst, showing hyperplastic epithelium by acanthosis, associated with intense inflammatory infiltrate in the capsule (HE, 400X); E) Dentigerous cyst (HE, 100X); F) Higher magnification of E showing atrophic epithelial lining (HE, 400X); G) Epithelial lining of dentigerous cyst, similar to reduced enamel epithelium (HE, 400X); H) Dentigerous cyst showing hyperplastic epithelium by acanthosis, associated with intense inflammatory infiltrate in the capsule (HE, 400X).

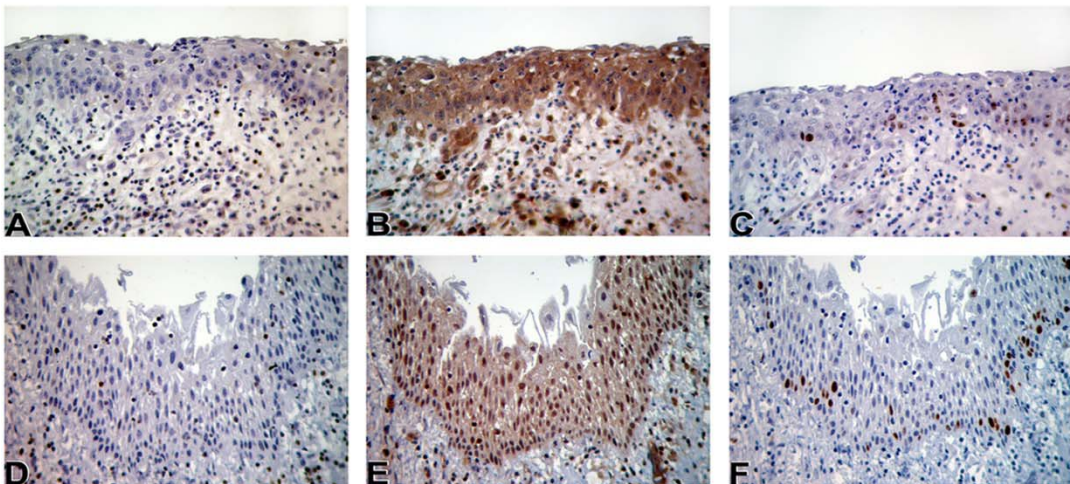


Figure 2 Immunohistochemical reactivity in lining epithelium of radicular cysts (RCs) (x400). Expression of Bcl-2 in the cytoplasm of basal cells in atrophic (A) and hyperplastic (D) epithelium. Expression of Caspase-3 in the cytoplasm of basal, suprabasal and superficial cells in atrophic (B) and hyperplastic (E) epithelium. Expression of Ki-67 in the nuclei of basal cells in atrophic (C) and hyperplastic (F) epithelium.

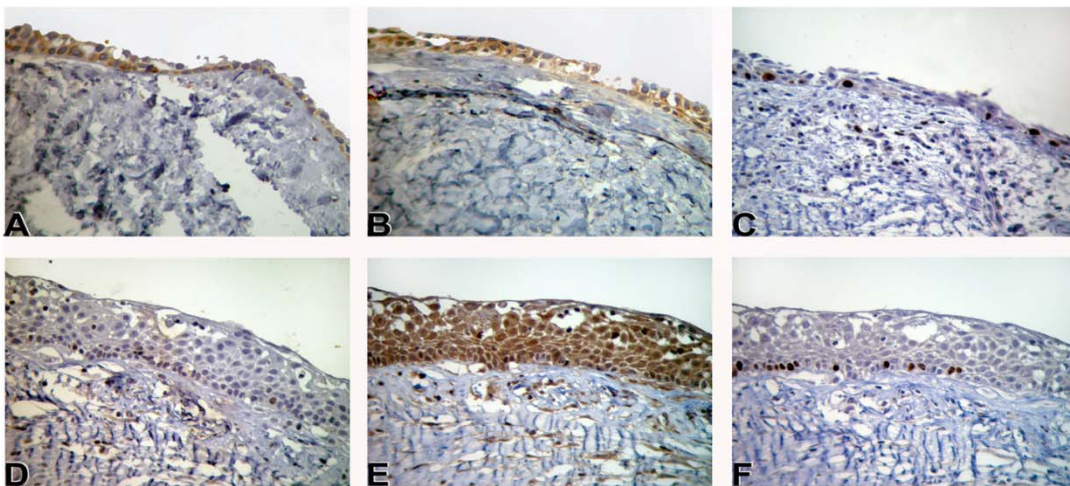


Figure 3 Immunohistochemical reactivity in lining epithelium of dentigerous cysts (DCs) (x400). Expression of Bcl-2 in the cytoplasm of basal cells in atrophic (A) and hyperplastic (D) epithelium. Expression of Caspase-3 in the cytoplasm of basal, suprabasal and superficial cells in atrophic (B) and hyperplastic (E) epithelium. Expression of Ki-67 in the nuclei of basal cells in atrophic (C) and hyperplastic (F) epithelium.

Table 1 Primary antibodies used for immunohistochemical studies

| Antigen | Clonality | Dilution | Source |
|---------------------------|------------|----------|---|
| Caspase-3 (CPP32) | Monoclonal | 1: 200 | Novocastra, Benton Lane, United Kingdom |
| Ki-67 (Clone MIB-1) | Monoclonal | 1: 300 | Dako Cytomation, Glostrup, Denmark |
| Bcl-2 protein (Clone 124) | Polyclonal | 1: 200 | Novocastra, Benton Lane, United Kingdom |

Table 2 Immunohistochemical findings of cell activities and related factors in lining epithelium of radicular (RCs) and dentigerous (DCs) cysts.

| | Caspase-3 | Ki-67 | Bcl-2 |
|---------------------|---------------|-------------|--------------|
| RCs (n = 17) | 28,97 ± 7,54 | 8,64 ± 6,43 | 0,30 ± 0,63 |
| DCs (n = 9) | 29,81 ± 10,99 | 8,34 ± 6,44 | 1,96 ± 3,07* |
| P | P = 0,8205 | P = 0,9100 | P = 0,0404 |

Student *t* test.

Statistical significance: * *P* < 0,05.

Referência Consultada

1. Aplicação da Classificação Internacional das Doenças para Odontologia e Estomatologia – ICD-DA. 3 ed. Organização Mundial da Saúde (OMS), Gênova, 1995. 246p. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/1995/9241544678_eng.pdf> Acesso em: 26 abr. 2009.
2. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; 20: 340-349.
3. Nair PN. New perspectives on radicular cysts: do they heal? *Int Endod J.* 1998 May; 31(3):155-60. Review
4. Lin LM, Huang GT, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod.* 2007 Aug; 33(8):908-16. Epub 2007 Apr 2. Review.
5. Nair PN, Sundqvist G, Sjögren U. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106(2):294-303.
6. Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 Jan; 81 (1):93-102.
7. Bhaskar SN. Periapical lesions--types, incidence, and clinical features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966 May;21(5):657-71.
8. Mateus GCP, Lanza GHSP, Moura PHR, Marigo HA, Horta MCR. Cell proliferation and apoptosis in keratocystic odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 Nov 1; 13(11):E697-702.
9. Edamatsu M, Kumamoto H, Ooya K, Echigo S. Apoptosis-related factors in the epithelial components of dental follicles and dentigerous cysts associated with impacted third molars of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Jan; 99(1):17-23.
10. Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. Histological typing of odontogenic tumours. 2 ed. Springer-Verlag, Berlin; 1992. 124p.
11. Lin LM, Ricucci D, Lin J, Rosenberg P. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. *J Endod.* 2009; 35(5): 607-15.
12. Simon JH. Incidence of periapical cysts in relation to the root canal. *J Endod.* 1980 Nov; 6(11):845-8.
13. Satchell PG, Gutmann JL, Witherspoon DE. Apoptosis: an introduction for the endodontist. *Int Endod J.* 2003 Apr; 36(4):237-45.
14. Estrela C. *Ciência Endodôntica*. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas; 2004. 1010p.
15. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 798p.
16. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004, 15(6):348-381.
17. Silveira EJD, Piva MR, Galvão HC, Souza LB, Freitas RA. Participação das metaloproteinases da matriz na etiopatogenia dos cistos odontogênicos. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43(3):203-209.

18. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 297-306.
19. Soares J, Santos F, Silveira F, Nunes E. Nonsurgical treatment of extensive cyst-like periapical lesion of endodontic origin. *Int Endod J* 2006; 39: 566-575.
20. Murphy WK, Kaugars GE, Collett WK, Dodds RN. Healing of periapical radiolucencies after nonsurgical endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 May; 71(5):620-4.
21. Siqueira JF, Rôcas IN, Riche FNSJ, Provenzano JC. Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106 (5): 757-62.
22. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35:495-516.
23. Doonan F, Cotter TG. Morphological assessment of apoptosis. *Methods.* 2008 Mar; 44(3):200-4.
24. Bortner CD, Cidlowski JA. Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death. *J Biol Chem.* 2003 Oct 3; 278(40):39176-84.
25. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran: Patologia: Bases Biológicas das Doenças. 7 ed. Elsevier; 2005. 1504p.
26. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res.* 2007 May 1; 139(1):143-56.
27. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.* 1997 Apr 15; 57(8):1605-13.
28. Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods.* 2008 Mar; 44(3):262-72. Review.
29. Lawen A. Apoptosis - an introduction. *BioEssays.* 2003 Sep; 25(9): 888-896.
30. Bran GM, Stern-Straeter J, Hörmann K, Riedel F, Goessler UR. Apoptosis in bone for tissue engineering. *Arch Med Res.* 2008 Jul; 39(5):467-82.
31. Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas G, Androutsos G. A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkol.* 2008; 31: 702-06.
32. Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol.* 1996 Feb; 27(2):102-10. Review.
33. Faria MHG, et al. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42(4): 271-278.
34. Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick CW Jr. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51(5):575-84.
35. Takahashi K, MacDonald D, Murayama Y, Kinane D. Cell synthesis, proliferation and apoptosis in human dental periapical lesions analysed by in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Oral Dis.* 1999 Oct; 5(4):313-20.

36. Liu SC, Klein-Szanto AJP. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol.* 2000; 36:145-51.
37. Arisawa EAL, Moraes E, Rocha RF, Almeida JD. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67, breve revisão. *Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos.* 1999; 2(1): 54-60.
38. Gurgel CAS, Ramos EAG, Azevedo RA, Sarmento VA, Carvalho AMS, Santos JN. Expression of Ki-67, p53 e p63 proteins in keratocyst odontogenic tumours: an immunohistochemical study. *J Mol Hist.* 2008; 39: 311-16.
39. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopatol.* 1990; 17(6):489-503.
40. Tosios KI, Kakarantza-Angelopoulou E, Kapranos N. Immunohistochemical study of bcl-2 protein, Ki-67 antigen and p53 protein in epithelium of glandular odontogenic cysts and dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med.* 2000 Mar; 29(3):139-44.
41. Cummings BJ, Mason AJ, Kim RC, Sheu PC, Anderson AJ. Optimization of techniques for the maximal detection and quantification of Alzheimer's-related neuropathology with digital imaging. *Neurobiol Aging.* 2002; 23(2): 161-70.
42. Rasband W. ImageJ documentation. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>>. Acesso em 19 de mai. 2009.
43. Dias FC (2008) Uso do software ImageJ para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais. Dissertação (Mestrado do Curso de Pós-graduação em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores), São Paulo, São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), 148f. Disponível em: < <http://mtc-m17.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/mtc-m17@80/2008/04.30.20.23/doc/publicacao.pdf> >. Acesso em 19 de mai. 2009.

APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE

APÊNDICE A – Metodologia Expandida

1. Preparo dos cortes histológicos e reativação antigênica

Os cortes teciduais de 3µm de espessura foram montados sobre lâminas preparadas em solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona PA, sendo mantidos em estufa a uma temperatura de 50°C durante uma hora para fixação dos cortes nas lâminas. Para desparafinização, as lâminas foram imersas em três banhos de xilol por cinco minutos cada e em seguida os cortes foram hidratados com passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (absoluto, 90%, 80% e 70%), finalizando com rápida lavagem em água destilada.

Para evitar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas, a atividade endógena da peroxidase foi bloqueada através da imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 3,0% e metanol absoluto (V/V), em uma passagem de 20 minutos, seguida de duas passagens em água destilada.

Devido a fixação em formol e inclusão em parafina, os sítios de ligação antígeno-anticorpo (epítomos) podem ser mascarados, sendo necessária a recuperação antigênica previamente à incubação do anticorpo primário. Assim, as lâminas foram imersas em solução composta por 180mL de ácido cítrico 0,1M (MERK, São Paulo/SP, Brazil) e 820mL de citrato de sódio 0,1M (MERK, São Paulo/SP, Brazil) em pH 6,0, diluída em 1:10 em água destilada, em banho-maria entre 95-98°C por 35 minutos. Após esse período, ainda como parte do processo de reativação através do calor, as lâminas foram retiradas do banho-maria e mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz, seguida de rápida passagem em água destilada, e imersão em tampão salina fosfato (PBS: NaCl 137mM, KCl 2mM e tampão fosfato 10mM, pH 7,2-7,4) (SIGMA CO., St. Louis, MO, USA).

2. Detecção imunoistoquímica

Foram utilizados anticorpos primários para detecção dos antígenos Bcl-2, Ki-67 e caspase-3 (Tabela 1), utilizando-se um corte tecidual para cada reação. Os anticorpos foram preparados na diluição específica recomendada pelo fabricante em uma solução comercial reagente bloqueadora de reação inespecífica (Líquido Dilvidol de Anticorpos, Da Vinci Green Diluent, Biocare Medical, Rio de Janeiro/RJ, Brazil). A incubação primária foi obtida adicionando 200µl da solução de anticorpo diluído sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida entre 2-8°C por 12 horas. Após esse período realizou-se dupla lavagem dos cortes em tampão PBS por 5 minutos cada, à temperatura ambiente, seguida da incubação com anticorpo secundário anti-IgG biotilado conjugado com um polímero de peroxidase (EN VISION PLUS, Dako Cytomation) pronto para uso, durante uma

hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Passado o período de incubação, as amostras foram lavadas por duas vezes em PBS por 5 minutos cada à temperatura ambiente.

Para detecção da reação, as amostras foram cobertas com solução cromógena composta por 100mL de PBS, 60mg de DAB (diaminobenzidina: 3,3',4,4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochloride), 2mL de DMSO para solubilizar a DAB, e 60µl de peróxido de hidrogênio, por no máximo 5 minutos, observando macroscopicamente o desenvolvimento da coloração. A contracoloração foi obtida pela imersão em solução aquosa de hematoxilina de Harris por um minuto, seguida da lavagem em água corrente até o desaparecimento da coloração azulada na água. Para auxiliar na remoção do corante em excesso, os cortes foram imersos rapidamente em solução aquosa de hidróxido de amônia a 1% (água amoniacal) com subsequente lavagem em água corrente.

Por fim, realizaram-se os processos de desidratação com passagens sucessivas em soluções crescentes de etanol (70%,80%,90% e absoluto), diafanização com três banhos sucessivos de xilol e montagem em meio permanente (ENTELLAN®). O controle negativo para cada caso foi obtido pela abolição do anticorpo primário nas reações e para controle positivo foi utilizado um linfonodo.

3 Análise das reações imunoistoquímicas

Todos os cortes foram examinados com microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), previamente ajustado em relação à intensidade de luz e abertura do diafragma, tornando-se padrão para todas as análises. Utilizando a objetiva de 40X selecionou-se 10 campos consecutivos representativos do epitélio de revestimento dos cistos que foram fotografados, através de uma câmera digital (Cannon A620) acoplada ao microscópio, e digitalizados para o computador.

O contraste de todas as imagens foi padronizado com intensidade de 0,5% para haver a melhor identificação das células positivas, caracterizadas pela coloração castanha do núcleo para o marcador Ki-67 e do citoplasma para Bcl-2 e caspase-3.

A análise quantitativa das reações imunoistoquímicas foi obtida através do software de análise e processamento de imagens NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland, EUA) (41 – 43).

Para Ki-67 o programa auxiliou na contagem de 1000 células epiteliais para cada lesão em até 10 campos, e posteriormente forneceu o valor em porcentagem da relação entre o número de células coradas e as células epiteliais totais.

Para Bcl-2 e Caspase-3, em virtude da marcação citoplasmática, optou-se pelo cálculo da área corada relativa à área total do epitélio em cada campo analisado. Para tanto, através do programa foram testados limiares ou *thresholds*, padrões de marcação em escala de pixels, com diferentes densidades para selecionar o melhor contraste entre as células imunopositivas e a coloração de fundo. A partir do melhor limiar foi definido um modelo de imunopositividade, denominado de Macro. Utilizando o Macro específico para cada campo, o software forneceu a porcentagem de área corada (pixels positivos) em relação à área total (pixels totais) do epitélio.

APÊNDICE B – Fotomicrografias em diferentes aumentos dos cortes histológicos de cistos radiculares e cistos dentígeros corados em HE e pela técnica imunoistoquímica.

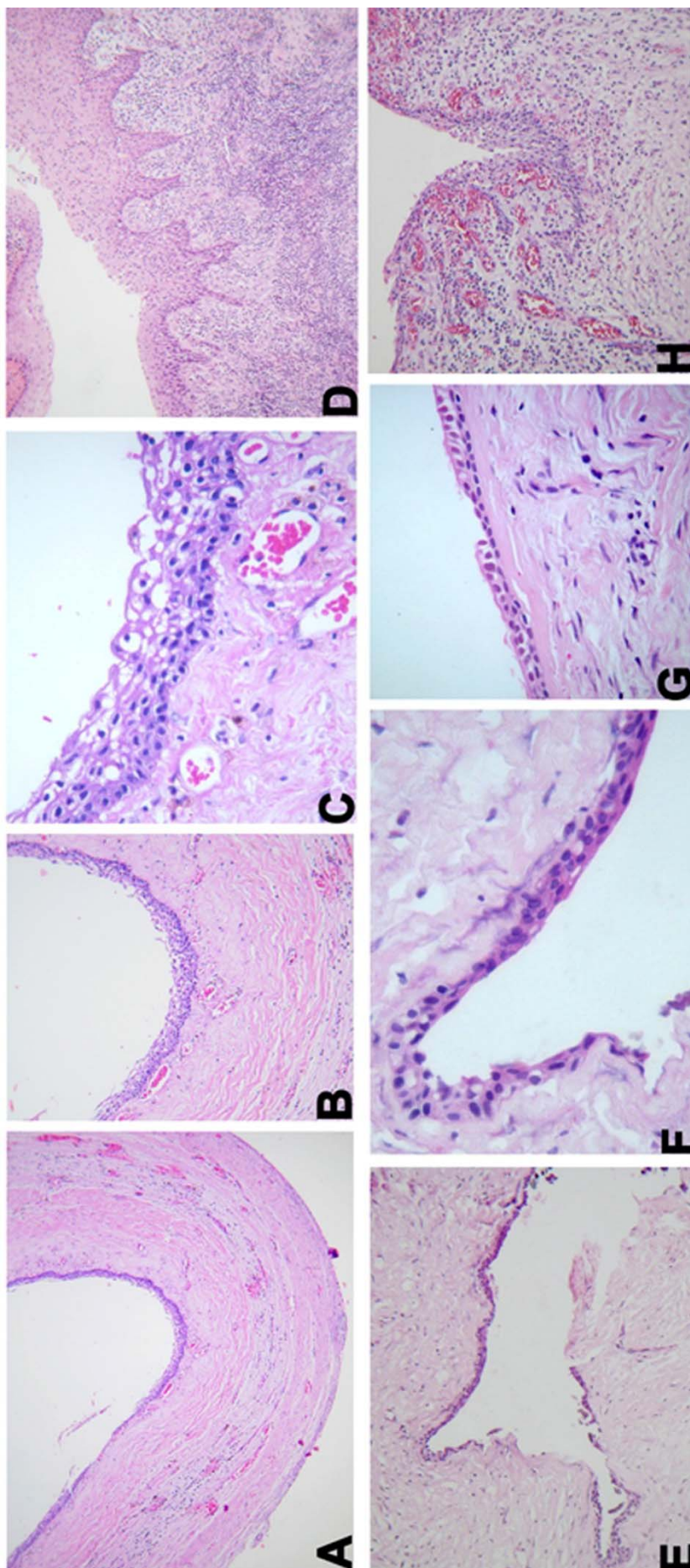


Figura 1 A) Cisto radicular (HE, 50x); B) Maior aumento de A, mostrando a espessura do revestimento epitelial e a cápsula de tecido conjuntivo fibroso (HE, 100x); C) Maior aumento de B, mostrando o epitélio de revestimento pavimentoso estratificado (HE, 400x); D) Cisto radicular, demonstrando epitélio hiperplasiado por acantose, associado a intenso infiltrado inflamatório na cápsula (HE, 400x); E) Cisto dentígeno (HE, 100x); F) Maior aumento de E mostrando epitélio de revestimento atrófico (HE, 400x); G) Epitélio de revestimento de cisto dentígeno, semelhante ao epitélio reduzido do órgão do esmalte (HE, 400x); H) Cisto dentígeno, demonstrando epitélio hiperplasiado por acantose, associado a intenso infiltrado inflamatório na cápsula (HE, 400x).

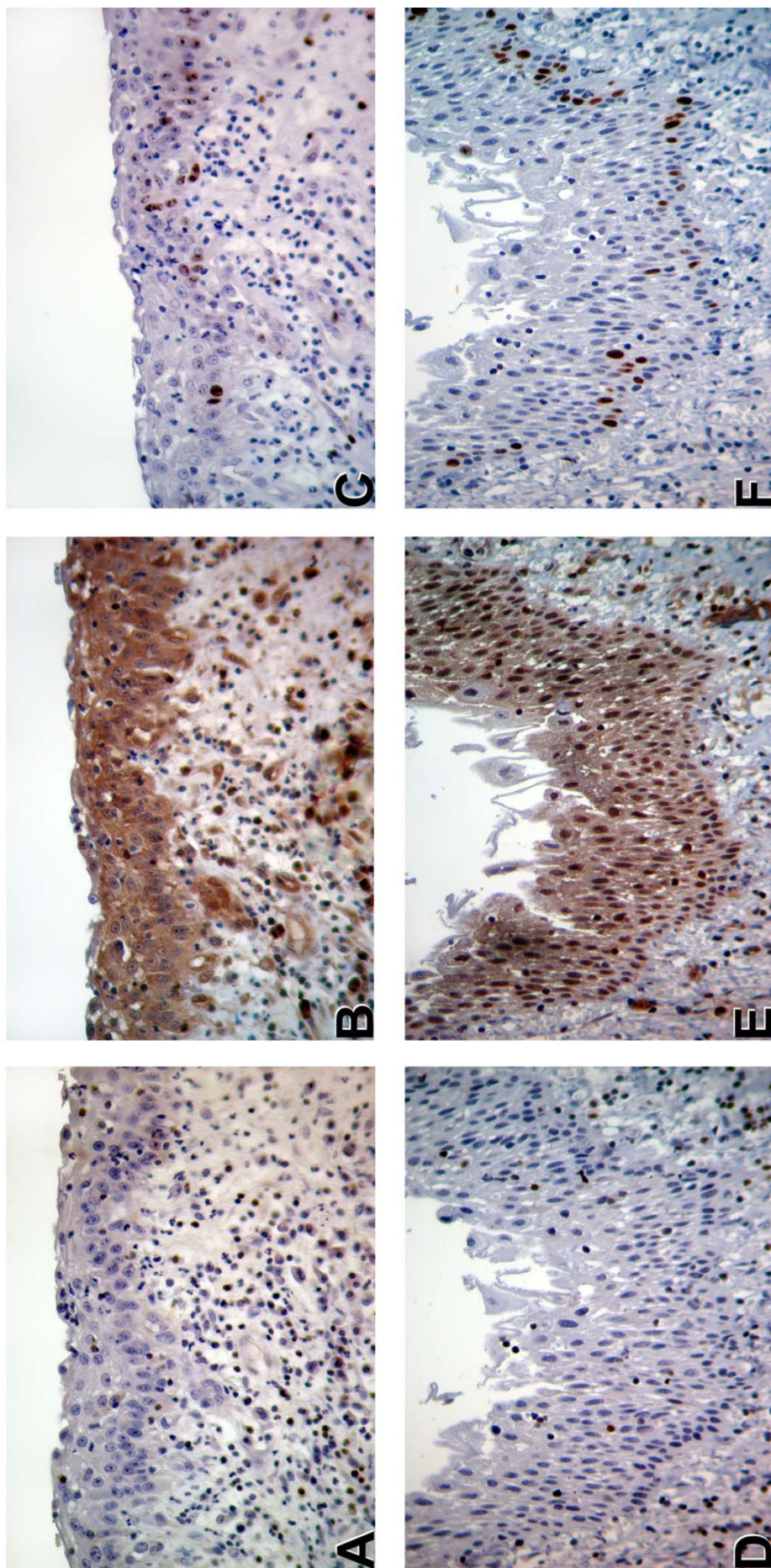


Figura 2 Cisto Radicular (LSAB, 400x): A) Expressão citoplasmática de Bcl-2 nas células da camada basal de epitélio atrófico; B) Expressão citoplasmática de Caspase-3 nas células das camadas basal, suprabasal e superficial de epitélio atrófico; C) Expressão nuclear de Ki-67 nas células basais de epitélio atrófico; D) Expressão citoplasmática de Bcl-2 nas células da camada basal de epitélio hiperplásico; E) Expressão citoplasmática de Caspase-3 nas células das camadas basal, suprabasal e superficial de epitélio hiperplásico; F) Expressão nuclear de Ki-67 nas células basais de epitélio hiperplásico.

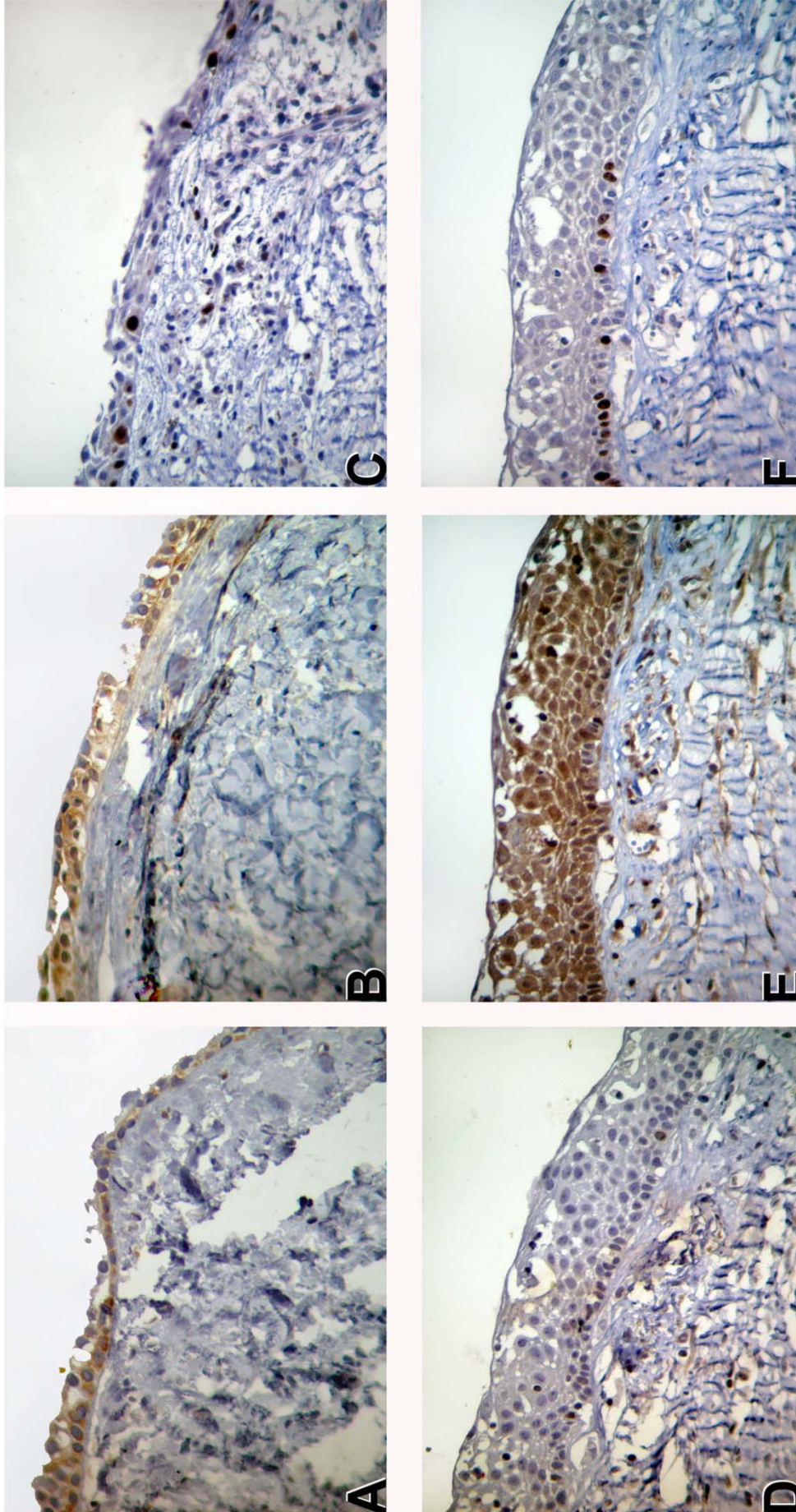
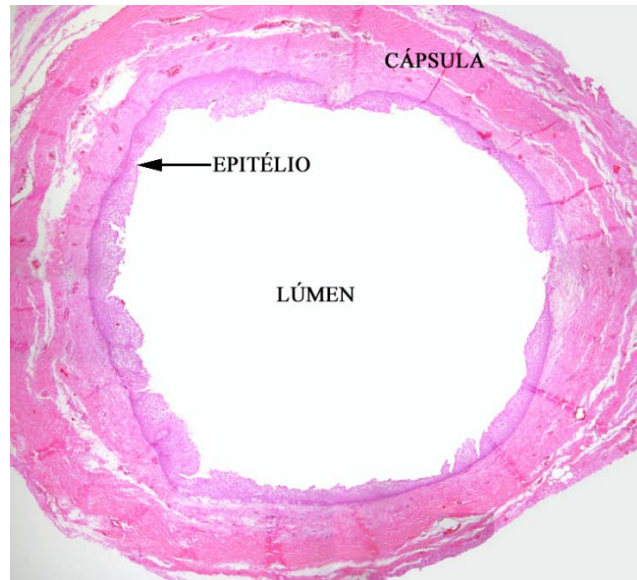


Figura 3 Cisto Dentígero (LSAB, 400x): A) Expressão citoplasmática de Bcl-2 nas células da camada basal de epitélio atrófico; B) Expressão citoplasmática de Caspase-3 em epitélio atrófico; C) Expressão citoplasmática de Bcl-2 nas células da camada basal de epitélio hiperplásico; D) Expressão citoplasmática de Caspase-3 nas células das camadas basal, suprabasal e superficial de epitélio hiperplásico; E) Expressão nuclear de Ki-67 nas células basais de epitélio hiperplásico; F) Expressão nuclear de Ki-67 nas células basais de epitélio hiperplásico.

APÊNDICE C – Figuras

C1 Constituição histológica básica dos cistos odontogênicos (HE, 20x).



ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Campus Universitário – Trindade – Florianópolis/SC – CEP 88040-370
Fone: (48) 3721-9549 – Cel: (48)84071931 – email: carolnine@yahoo.com.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado participante,

Todas as informações contidas neste termo foram fornecidas pela mestrande **Caroline Alberici Martins**, aluna de Pós-graduação de Odontologia, área Endodontia,

O objetivo deste documento é informar sobre o trabalho a ser realizado pela aluna **Caroline**, a fim de obter uma autorização por escrito para a sua participação espontânea na pesquisa.

O título do trabalho é **“Detecção imunoistoquímica de fatores relacionados à proliferação celular e o mecanismo da apoptose em cistos radiculares, residuais e dentígeros”**. O(a) Sr.(a) apresentou, no passado, um cisto, relacionado com um dente, o qual foi realizada a cirurgia para a retirada do mesmo. Esse material, após a cirurgia, foi enviado para o laboratório de Patologia Bucal para que fosse dado o diagnóstico definitivo. Após o diagnóstico, esse material ficou guardado na UFSC. Este trabalho pretende observar novamente esse material para investigar as alterações que existem nele, a fim de entender e conhecer melhor essa doença e, quem sabe, tentar ajudar os próximos pacientes que tenham a mesma doença no futuro.

Assinando este termo o(a) Sr.(a) concorda em participar do trabalho permitindo o acesso ao material pertencente ao senhor que se encontra na UFSC.

Em nenhum momento o nome do(a) Sr.(a) será vinculado a qualquer parte do trabalho.

Este procedimento não lhe causará qualquer prejuízo e após a coleta dos dados sua participação não será mais necessária. Contudo o(a) Sr.(a) tem a garantia que receberá respostas ou esclarecimentos a todas as suas perguntas sobre os assuntos relacionados ao trabalho, por meio do contato com o pesquisador de segunda à sexta-feira, no Laboratório de Endodontia, do CCS/UFSC, ou nos telefones (48) 3721 9549 ou (48) 84071931 (telefone celular). A pesquisadora assume o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtidas durante o estudo.

O(a) Sr.(a) tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo, sem qualquer represália ou prejuízo, através dos possíveis contatos escritos acima, ou ainda pelo e-mail carolnine@yahoo.com.br.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu,....., portador(a) do RG:..... e CPF:..... concordo em participar do trabalho: **“Detecção imunoistoquímica de fatores relacionados à proliferação celular e o mecanismo da apoptose em cistos radiculares, residuais e dentígeros”**, bem como autorizo a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de minha identificação, conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos desta Universidade. A minha participação é voluntária podendo ser cancelada a qualquer momento.

Florianópolis,..... de de 200...

Assinatura do participante

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos

Campus Prof. João David Ferreira Lima – CEP 88040-900
Trindade - Florianópolis - Santa Catarina - Brasil | www.cep.ufsc.br / +55 (48) 3721-9206

PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO Nº 017/2009**I – Identificação:**

- **Título do Projeto:** Detecção imunoistoquímica de fatores relacionados à proliferação celular e o mecanismo de apoptose em cistos radiculares, residuais e dentígeros
- **Pesquisador Responsável:** Profa.Dra. Elena Riet Correa Rivero
- **Pesquisador Principal:** Caroline Alberice Martins
- **Data Coleta dados: Início:** Março/2009 **Término previsto:** Dezembro/2009
- **Local onde a pesquisa será conduzida:** Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC

II - Objetivos:

O objetivo deste trabalho é investigar os mecanismos de proliferação celular e apoptose no epitélio de revestimento de cistos radiculares e cistos residuais por meio de detecção imunoistoquímica de proteínas bcl-2, bax, caspase 3 e do marcador de proliferação celular Ki-67. Os resultados serão comparados com um cisto dentígero, um cisto odontogênico de desenvolvimento.

III – Comentário.

Trata-se de projeto devidamente documentado. O tema é relevante. O trabalho é importante, porquanto é escassa a literatura que trata dos mecanismos biológicos responsáveis pelo desenvolvimento, crescimento e involução dos cistos radiculares. Há um bem elaborado plano para a obtenção de consentimento livre e esclarecido. Os princípios bioéticos foram atendidos.

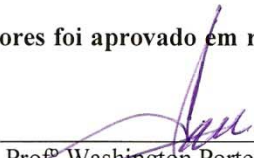
V – Parecer CEP:

(x) Aprovado

PARECER:

Tendo em vista o exposto, somos de parecer favorável à aprovação do referido projeto.

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado em reunião deste Comitê na data de 16 de fevereiro de 2009.


Prof.^o Washington Portela de Souza
Coordenador do CEPESH

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/ 96 e 251/ 97 do CNS.